

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



**Infiltración de Células
Inmunocompetentes en los
Tumores Malignos de Glándulas
Salivares**

TESIS DOCTORAL

Luis Ángel Ceceñas Falcón

Madrid, 2014

AGRADECIMIENTOS:

al Prof. Dr. **Jesús Áncer Rodríguez**, quién desde el principio y gracias a su constante perseverancia ha permitido obtener excelentes resultados académicos en todas las actividades del Convenio de la UANL con la UAM; pero además mi más sincera gratitud, porque siempre me guió con inteligencia y generosidad para que desarrollara mi actividad como patólogo.

al Prof. Dr. **Javier Regadera**, por sus valiosos consejos en la dirección de este estudio, por su constante motivación hacia mí, por su apoyo y, sobre todo, por su sincera amistad.

al Dr. **Luis Alberto Condezo-Hoyos**, por su invaluable ayuda en el análisis estadístico de los casos.

a mis compañeros y amigos **Profesores del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario y Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.**

a las **Autoridades Académicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y de la Universidad Autónoma de Madrid**, gracias a cuyo generoso esfuerzo y al Convenio Bilateral entre ambas Universidades ha sido posible culminar esta Tesis Doctoral.

y, de modo muy especial,
a mi Alma Mater:
la Universidad Autónoma de Nuevo León.

DEDICATORIA:

*a mi esposa, **Patricia Amanda Quevedo Garza**,
Por su apoyo incondicional*

*a mis hijos, **Luis Ángel y Guillermo***

*a mi madre, **Consuelo Falcón Garza**, in memoriam*

*a mi padre, **Jesús María Ceceñas Lerma**,
por su ejemplo constante de honradez*

INTRODUCCIÓN	7
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS GLÁNDULAS SALIVARES	9
CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES Y SISTEMA INMUNE	12
CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES Y CÁNCER	17
TUMORES DE GLÁNDULAS SALIVARES	21
CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES DE GLÁNDULAS SALIVARES	22
<i>Tumores Benignos</i>	24
<i>Tumores Malignos</i>	25
Carcinoma Mucoepidermoide	25
Carcinoma de Células Acinares	27
Carcinoma Adenoide Quístico	27
Carcinoma Epitelial Mioepitelial	28
Adenocarcinoma Polimorfo de Bajo Grado	29
PATOLOGÍA MOLECULAR DE LOS TUMORES DE GLÁNDULAS SALIVARES	31
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
MATERIAL Y MÉTODOS	39
MATERIAL	40
MÉTODOS	41
<i>Métodos de Estudio Histológico General</i>	41
Fijación de las Piezas	41
<i>Métodos de Secciones con Microtomo y Tinciones Histológicas</i>	41
<i>Método Inmunohistoquímico de la Expresión Proteica</i>	41
<i>Método Inmunohistoquímico de Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP)</i>	42
<i>Métodos de Cuantificación de la Intensidad de Inmunoexpresión</i>	44
<i>Métodos Estadísticos</i>	45
<i>Técnicas Fotográficas</i>	45
RESULTADOS	46
<i>Células Inmunocompetentes en Glándulas Salivares Normales</i>	52
<i>Carcinoma Adenoideo Quístico</i>	53
<i>Carcinoma de Células Acinares</i>	57
<i>Adenocarcinoma Ductal</i>	61

<i>Carcinoma Mucoepidermoide</i>	65
<i>Carcinoma Epitelial-Mioepitellial</i>	72
<i>Adenocarcinoma Polimorfo</i>	76
TUMORES MALIGNOS DE ALTO GRADO: COMPARACIONES DE CADA UNO DE LOS MARCADORES DE CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES ENTRE LA ZONA DE INVASIÓN Y LA MASA PRINCIPAL INTRATUMORAL	80
TUMORES MALIGNOS DE BAJO GRADO: COMPARACIONES DE CADA UNO DE LOS MARCADORES DE CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES ENTRE LA ZONA DE INVASIÓN Y LA MASA PRINCIPAL INTRATUMORAL	83
COMPARACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA CADA UNO LOS MARCADORES DE CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES EN LAS ZONAS DE INVASIÓN TUMORAL ENTRE LOS GRUPOS DE BAJO GRADO Y ALTO GRADO DE TUMORES SALIVARES MALIGNOS	86
ESTUDIO DE CORRELACIÓN	88
<i>Estudio de Correlación en los Tumores Malignos de Alto Grado para cada uno de los Marcadores de Células Inmunocompetentes</i>	89
<i>Estudio de Correlación en los Tumores Malignos de Bajo Grado para cada uno de los Marcadores de Células Inmunocompetentes</i>	99
DISCUSIÓN	102
CONCLUSIONES	118
RESUMEN	120
SUMMARY	122
REFERENCIAS	124

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas han aparecido estudios centrados en la importancia de las células inmunocompetentes en diferentes tumores,^{1,10,13,19,21,68,81,127,131,141,145} Sin embargo, en el caso particular de los tumores de glándulas salivares la caracterización inmunohistoquímica de las células inmunocompetentes ha sido muy escasamente referida en la literatura mundial.^{73,81,121,131,136} Es más, en nuestro conocimiento y relación con la presencia de células inmunocompetentes en tumores benignos y malignos de las glándulas salivares solo se ha publicado el trabajo de Karja *et al.*, 1995.⁷² Estos autores presentaron una serie de 216 tumores salivares, en la que evaluaron los linfocitos B mediante IgA, IgG, IgM y células T, llegando a conclusiones preliminares, por ello estos autores enfatizan acerca de la necesidad de realizar más estudios para dilucidar el papel de las células T y sus variedades en la patogénesis y en el pronóstico de los tumores de las glándulas salivares.

Contrariamente, en la patología inflamatoria de las glándulas salivares los infiltrados linfoides son frecuentes y aparecen en una amplia variedad de condiciones patológicas que incluyen enfermedades auto-inmunes, linfomas y respuestas inmunorreguladoras a neoplasias parenquimatosas.^{6,34,61,67} De hecho, la mayor parte de los trabajos de investigación sobre células inmunocompetentes en glándulas salivares se han encaminado a dilucidar los fenómenos asociados con la patología autoinmune y en particular con el síndrome de Sjögren,^{65,135,158} existiendo una amplia evidencia en la literatura mundial.^{8,27,80,90,115,139,144}

Una revisión amplia de la literatura nos permite corroborar que no se han efectuado estudios sistematizados acerca del inmunofenotipo de las células inmunocompetentes en los tumores malignos de glándulas salivares, motivo del presente trabajo de investigación como Tesis Doctoral. Por ello, es necesario, ante la novedad del tema, sentar las bases histológicas y moleculares de la infiltración de tejido linfoide asociado a tumores y su participación en la carcinogénesis de tumores glandulares, incluido el cáncer de mama; así mismo, es conveniente relacionar el significado histopatológico y funcional de la respuesta de células inmunocompetentes, junto con otros marcadores inmunohistoquímicos y moleculares que participan en la regulación de mecanismos de transformación y progresión tumoral.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS GLÁNDULAS SALIVARES

Las glándulas salivares mayores -parótida, submaxilar y sublingual- y las glándulas salivares menores -distribuidas en cavidad oral, nasofaringe, laringe y en las vías respiratorias inferiores- participan en humedecer y lubricar la mucosa del tracto aerodigestivo superior, controlan la flora bacteriana de la cavidad oral, y la amilasa salivar que producen inicia la descomposición de las proteínas en la primera fase de la digestión. El volumen diario de saliva producido por las glándulas salivares varía de 750 a 1500 ml.^{96,142} La saliva se encuentra constituida por un 99.5% de agua y un 0.5% de solutos, como sodio, potasio, iones cloruros, bicarbonato y fosfato, y además contiene urea, ácido úrico, lisozima e Inmunoglobulina A.⁹³ Los iones de cloruro activan la amilasa salival, los iones de bicarbonato y fosfato amortiguan los alimentos ácidos, la amilasa salival actúa metabolizando los almidones y la lipasa lingual actúa sobre los triglicéridos. La secreción mucosa de las glándulas salivares lubrica y ayuda a disolver los alimentos, formando el bolo y facilitando su deglución.¹⁴²

La Glándula Parótida se localiza detrás de la rama del maxilar inferior, por delante y debajo del conducto auditivo externo, limitada hacia delante por el músculo masetero, hacia arriba por el arco cigomático, hacia atrás por el trago y hacia abajo por el músculo esternocleidomastoideo.⁸⁶ La glándula parótida adulta es la más grande de las tres glándulas salivares mayores y su peso varía de 14 a 28 g, se encuentra rodeada por una cápsula de tejido fibroadiposo y está dividida en dos porciones por el nervio facial, siendo la porción más grande el lóbulo superficial. En un 20 a 56% se puede encontrar tejido parotídeo accesorio en la porción anterior de la glándula o a lo largo del conducto parotídeo principal,⁸⁶ denominado conducto de Stensen (o de Stenon) el cual se forma en el espesor de la parótida por la coalescencia de los dos conductos lobares principales. El conducto de Stenon sigue hacia delante por debajo del arco cigomático en un trayecto de 7 cm, atravesando el músculo masetero, el tejido adiposo y el músculo buccinador, antes de abrirse en el vestíbulo oral, frente al segundo molar superior. La irrigación de la glándula parótida es por ramas de la arteria carótida externa y el drenaje venoso es por tributarias de la yugular externa. El drenaje linfático va hacia los ganglios cervicales superficiales y profundos. La inervación está dada por los nervios simpático y auriculotemporal.⁸⁶

La Glándula Submaxilar se localiza en el triángulo submandibular, pesa de 7 a 8 g y su arquitectura se encuentra organizada en lóbulos drenados por conductos excretores que terminan en un único conducto principal, denominado conducto de Wharton, el cual mide 5 cm y se abre en la cavidad oral, en la carúncula sublingual situada a ambos lados del frenillo lingual. La irrigación de la glándula es a través de ramas de la arteria facial y sublingual y la inervación es mediante fibras parasimpáticas del nervio facial y de los plexos cervicales superiores. Su drenaje linfático es hacia los ganglios ubicados en grupos anterior, medio y posterior, localizados entre la mandíbula y la glándula.⁹⁶

La Glándula Sublingual pesa 3 g y se localiza en la fosa sublingual de la mandíbula, rodeada por tejido conectivo laxo, drena su secreción a través de un conducto principal (Conducto de Bartholin), el cual se abre al conducto submandibular y varios conductos pequeños (Conductos de Rivinus). Esta glándula recibe sangre de las arterias sublingual y submentoniana y el drenaje venoso es hacia venas tributarias de la yugular externa. La inervación es similar a la glándula submaxilar.⁹⁶

Histológicamente, las glándulas salivares son glándulas exocrinas tubuloacinares. Existen tres tipos de unidades secretoras salivares: los acinis serosos que contienen amilasa, los acinis mucosos que contienen sialomucinas y los acinis mixtos seromucosos.⁹⁶ La glándula parótida es serosa, la submaxilar es mixta con predominio de acinis serosos y la sublingual es mixta con predominio de acinis mucosos. El estroma glandular consiste en bandas de tejido conectivo que forman una arquitectura lobular, y contiene vasos sanguíneos y linfáticos y terminaciones nerviosas. El sistema ductal excretor está formado por conductos intralobulillares -conductos intercalados y conductos estriados- y por conductos interlobulillares que coalescen progresivamente para drenar la secreción salivar al conducto principal glandular.⁹⁶ El conducto intercalado es más largo en la glándula parótida y más corto en la glándula submaxilar.

Las Células de Reserva de los conductos intercalados son la fuente de regeneración del tejido acinar y el sistema de ductos terminales y se piensa también que junto con las células mioepiteliales son las progenitoras de la mayoría de los tumores de las glándulas salivares.³² Sin embargo, recientemente se ha publicado que las células basales y lumbinales de todo el

sistema de ductos, e incluso las células acinares, tienen la capacidad de proliferar y, potencialmente, originar neoplasias, aunque aún existe controversia sobre la existencia de células indiferenciadas progenitoras en la capa basal de los conductos intercalado y estriado.³¹ De hecho es en los conductos estriados donde se localizarían las hipotéticas células indiferenciadas pluripotenciales, implicadas en las alteraciones metaplásicas y neoplásicas de las glándulas salivares, las cuales son más frecuentes en estos conductos. Las células de reserva de las glándulas salivares, al ser progenitoras de unidades secretoras túbuloacinares,⁸⁷ pueden proliferar y regenerar después de procesos inflamatorios, incluidos los que ocurren en las sialoadenitis autoinmunes, pero estos procesos son lentos y su estudio aún se encuentra en fase experimental.⁸⁴

Las Células Mioepiteliales derivan de las células ductales salivares pluripotenciales primitivas, alrededor de la 10ª semana de gestación. Se localizan entre las células epiteliales, la lámina basal del acino y de los conductos intercalares y estriados, son aplanadas y con largos procesos citoplasmáticos que se extienden sobre la superficie epitelial. Poseen miofilamentos citoplasmáticos de actina, tropomiosina y miosina. En las glándulas salivares con patologías inflamatorias o neoplásicas, se pueden encontrar variedades morfológicas de células mioepiteliales: célula estrellada o mixoide (S-100+ y vimentina+), célula mioide fusiforme (vimentina+ y actina-miosina+), célula plasmocitoide o hialina (citokeratina+, vimentina+ y S-100+) y la célula clara (citokeratina+, actina-miosina+ y S-100+).⁹⁶ De otra parte, Ianez *et al.*, en 2010,⁶⁶ estudiaron la expresión de marcadores mioepiteliales en glándulas salivares mayores y menores en fetos de 8 a 16 semanas, mediante inmunohistoquímica y concluyen que la expresión de actina de músculo liso, calponina, CD29, S100 y p63 está presente desde los estadios tempranos en la maduración glandular salivar y aunque son marcadores mioepiteliales específicos, no son exclusivos de este tipo celular.⁶⁶

El Tejido Linfoide de las glándulas salivares está representado por pequeños acúmulos de células inmunocompetentes –preferentemente linfocitos y células plasmáticas– localizados en el parénquima glandular y por células linfoides aisladas.¹²⁴ Este tejido linfoide salivar comprende dos elementos del sistema inmune asociado a mucosas (MALT): uno está

constituido por células inmunocompetentes presentes en el tejido conectivo interlobulillar y también dentro de los lobulillos, en íntima vecindad con los acinos, y los conductos intercalares y estriados, de modo que cuando el tejido linfoide se dispone alrededor de los ductos, forma el denominado DALT;^{26,34} el otro componente del sistema inmunológico de las glándulas salivares corresponde al componente secretor, esto es, una glicoproteína receptora para IgA dimérica e IgM pentamérica producida por las células epiteliales de los acinos, y de los conductos intercalares y estriados. Las células plasmáticas presentes en las glándulas salivares producen principalmente IgA (cerca del 80% de las inmunoglobulinas de la saliva) y, en menor cantidad, IgG e IgM. Cerca de la superficie de la glándula parótida es frecuente encontrar pequeños ganglios linfáticos, a diferencia del resto de las glándulas, donde no se encuentran.⁹⁶

Si bien las células linfoides en las glándulas salivares normales son relativamente escasas, las glándulas salivares frecuentemente desarrollan hiperplasias linfoides en las enfermedades autoinmunes de las glándulas salivares, como son el síndrome de Sjögren, la enfermedad de Mikulicz y las sialoadenitis bacterianas o virales, entre las cuales son particularmente prominentes las linfadenopatías asociadas al SIDA/HIV. Contrariamente, en casos excepcionales este tejido linfoide puede proliferar, dando origen a linfomas generalmente de células B de bajo grado.^{34,61} Los linfomas de bajo grado predominan en todas las series reportadas,²² excepto en los pacientes con SIDA/HIV en los cuales los linfomas de alto grado de células grandes son casi exclusivos. Entre los linfomas de bajo grado, los de células B de la zona marginal son los linfomas primarios más frecuentes de las glándulas salivares.⁶⁸ Por último, en las glándulas salivares también se pueden encontrar linfomas T o T/NK, los cuales frecuentemente son extranodales y en asociación con el virus de Epstein-Barr.²²

CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES Y SISTEMA INMUNE

El sistema inmune está formado por la participación de diferentes tipos de células y moléculas inmunocompetentes que participan coordinadamente para mantener los mecanismos de defensa y conseguir la integridad del organismo. Todas las células del sistema inmune derivan de células madre de la médula ósea. Las células del sistema inmune

son los linfocitos T, los linfocitos B, los macrófagos y las células dendríticas. En el timo las células sufren un proceso de maduración y educación previa a su liberación al torrente circulatorio, esto les permite a las células T desarrollar la auto tolerancia de los tejidos propios. Los linfocitos solos no hacen una respuesta inmune efectiva, deben ser asistidos por los macrófagos y las células dendríticas.^{76,104}

Además de los órganos linfoides principales (médula ósea, timo, ganglios linfáticos, bazo), el Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) se encuentra ampliamente distribuido en el sistema gastrointestinal y en la vías respiratorias y génito-urinarias. En concreto, el Tejido Linfoide Asociado al Tubo Gastrointestinal (GALT) comprende las amígdalas, las adenoides (anillo de Waldeyer), las placas de Peyer y los agregados linfoides en el intestino grueso y apéndice, estómago y esófago; así como los linfocitos B y T y las células plasmáticas distribuidas difusamente en la lámina propia del intestino. Singular importancia tienen las placas de Peyer del íleon terminal, dado que los folículos linfoides y el tejido linfoide difuso que las constituyen están tapizados superficialmente por el epitelio de revestimiento intestinal, el cual posee gran número de linfocitos intraepiteliales y numerosas células M, caracterizadas por presentar pliegues complejos en su superficie; estas células epiteliales M participan en la transferencia de antígenos desde la luz intestinal a la placa de Peyer, lo cual facilita la generación de una respuesta inmune en la mucosa intestinal. Es más, se sabe que precursores de las células B y células de memoria son estimuladas por el antígeno en las placas de Peyer, las células pasan a los ganglios linfáticos mesentéricos, donde se amplifica la respuesta inmune. Posteriormente, los linfocitos activados pasan a la sangre a través del conducto torácico y llegan al intestino en donde llevan a cabo su función inmunológica final.

Los Linfocitos T representan el 60 a 70% del total de linfocitos en sangre periférica. En los ganglios linfáticos, se localizan en las áreas paracorticales; mientras que en el bazo es en los manguillos periarteriolas. La presencia de linfocitos T en áreas de daño tisular inflamatorio o en relación a tumores refleja una respuesta inmunológica específica a determinados epítomos. Cada célula T está genéticamente programada para reconocer a un antígeno específico unido a la célula mediante un receptor de la célula T específico del antígeno. Este complejo de receptor del antígeno en la célula T consiste en un heterodímero

unido por puentes bisulfuro y formado por una cadena polipeptídica alfa y otra beta (cada una de las cuales posee una región variable de unión al antígeno y otra constante); pero existe una minoría de células T en la sangre periférica en las que el receptor específico de antígeno está formado por cadenas polipeptídicas gamma y delta (en vez de alfa y beta) y estas células tienden a congregarse en las interfases epiteliales, como las mucosas del aparato respiratorio y digestivo. Tanto los receptores específicos de antígeno alfa y beta, como gamma y delta, se encuentran unidos a un grupo de cinco cadenas de polipéptidos por un enlace covalente formando el complejo molecular CD3. Estas proteínas CD3 no son variables, no se unen al antígeno, pero intervienen en la transducción de señales hacia la célula T una vez que se ha captado el antígeno.

Además de las proteínas CD3 las células T expresan muchas otras moléculas no polimórficas asociadas a su función, como CD4 y CD8, y otras moléculas accesorias, como CD2, CD11a, CD28 y el ligando CD40. Los linfocitos CD4 y CD8 son los más importantes y se expresan en dos subgrupos celulares de linfocitos T excluyentes entre sí. El 60% de las células CD3 positivas maduras expresan CD4, mientras que solo el 30% expresan CD8. Estas glucoproteínas asociadas a la membrana actúan como co-receptores en la activación de las células T. Durante la presentación del antígeno las moléculas CD4 se unen a porciones no polimórficas de las moléculas del MHC de clase II, expresadas por las células que presentan al antígeno, en cambio las moléculas CD8 se unen a las moléculas del MHC de clase I; gracias a estas interacciones, las células T colaboradoras CD4+ solo pueden reconocer a un antígeno en el contexto de los antígenos del MHC de clase II, mientras que las células T citotóxicas CD8+ reconocen a los antígenos unidos exclusivamente a las células que poseen moléculas del MHC de clase I. Las células T CD4+ son un regulador principal del sistema inmunitario, mediante la secreción de factores solubles, los diferentes tipos de citocinas, e influyen en la función de casi todas las células del sistema inmune, incluidas las otras células T, las células B, los macrófagos y las células citolíticas naturales (células NK).

En los últimos años se han descrito dos poblaciones funcionalmente distintas de células T colaboradoras CD4+:

- 1) el subgrupo 1 (T_H1), que sintetiza y secreta interleucina-2 e interferón gamma, y que facilita la hipersensibilidad retardada, la activación de los macrófagos y la síntesis de anticuerpos IgG2b, y
- 2) el subgrupo 2 (T_H2) que produce interleucina-4 e interleucina-5 y participa en la síntesis de IgE.

Las células T CD8 positivas son similares a las CD4 positivas, pueden secretar citocinas, sobre todo del subgrupo T_H1 , pero ejercen sus funciones actuando principalmente como células citotóxicas.⁷⁶

Los Linfocitos B constituyen el 10 a 20% de todos los linfocitos circulantes y se encuentran también en la médula ósea y en los órganos linfoides y formando parte del MALT. En los folículos linfoides, las células B, ante un estímulo antigénico, se transforman en células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas. Las células B reconocen a los antígenos a través del complejo receptor de antígeno de la célula B. Se sabe que la inmunoglobulina M presente en la superficie de todas estas células constituye el componente de unión al antígeno del receptor de superficie de las células B.⁷⁶

Los Macrófagos forman parte del sistema fagocítico mononuclear y son necesarios para que los antígenos sean procesados y presentados a las células T. Para que la inmunidad celular se desarrolle, es necesario que los macrófagos u otras células presentadoras de antígenos (células dendríticas y células B) los presenten procesados y unidos a sus membranas. También los macrófagos son células efectoras importantes en ciertas formas de inmunidad celular, ya que algunas citosinas, como el interferón gamma IFN gamma producido por las células T CD4+, los activan potenciando sus propiedades antimicrobicas y su capacidad para eliminar células tumorales. Además, los macrófagos son importantes en la fase efectora de la inmunidad humoral, ya que fagocitan los microorganismos que han sido opsonizados (cubiertos por IgG o C3b).⁷⁶

Las Células Dendríticas son células presentadoras de antígenos y tienen un papel preeminente en la iniciación y control de la respuesta inmune contra patógenos infecciosos. En glándulas salivares tienen un significativo papel en la secreción de inmunoglobulinas de

las células plasmáticas. La participación de las células dendríticas como presentadoras de antígenos y de las células T en el desarrollo del síndrome de Sjögren ha generado mucho interés y es motivo de numerosas líneas de investigación y publicaciones.^{8,81,135,139,144,158} Existen dos tipos de células dendríticas: células dendríticas interdigitantes y células dendríticas foliculares.

Las células dendríticas interdigitantes no son fagocíticas y expresan moléculas MHC de clase II, así como moléculas coestimulantes B7-1 y B7-2, y son las células presentadoras de antígenos más potentes para las células T CD4+; se encuentran ampliamente distribuidas en el organismo en el tejido linfoide y en muchos órganos no linfoides; además, en la piel existen células similares llamadas células de Langerhans. De otra parte, las células dendríticas foliculares se encuentra en los centros germinales y poseen receptores Fc para IgG, por lo que puede atrapar antígenos unidos a anticuerpos, interviniendo en la respuesta inmunitaria en progresión.⁷⁶ Las células dendríticas representan el 1% de las células sanguíneas mononucleares.^{81,127} Las células dendríticas presentes en los tumores malignos participan en mecanismos de regulación del crecimiento tumoral.¹³¹

Las Células Citolíticas Naturales NK representan el 10 a 15% de los linfocitos en sangre periférica y no poseen receptores del tipo de las células T ni inmunoglobulinas en su superficie, son algo mayores que los linfocitos pequeños y poseen numerosos gránulos azurófilos en su citoplasma por lo que se les ha llamado linfocitos granulares grandes. Poseen una capacidad innata para lisar células tumorales o células infectadas por virus y forman parte del sistema inmunitario natural. Poseen algunos marcadores de superficie de células T como CD2, pero no expresan CD3. Las células NK se identifican mediante dos moléculas de superficie: CD16 y CD56, en donde CD16 corresponde al receptor Fc para IgG, lo cual le proporciona la capacidad para lisar células blanco revestidas por IgG (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo). Las células NK inician la lisis celular; además las células NK secretan citosinas, como el factor de necrosis tumoral alfa, el factor estimulador de colonias de los granulocitos y macrófagos y el interferón gamma. A través de estos mediadores solubles las células NK pueden influir en las funciones de las células B y T.⁷⁶

CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES Y CÁNCER

El concepto de la inmunovigilancia en el cáncer fue propuesto por primera vez por Ehrlich en 1909, quien describió que las células tumorales se están produciendo continuamente y a la vez son destruidas espontáneamente por el sistema inmune, lo cual evita que se desarrolle el cáncer; así mismo propuso que este reconocimiento de las células neoplásicas por el sistema inmune podría ser un mecanismo capaz de eliminar las células neoplásicas.^{20,39,57,58} En este sentido, se ha demostrado que la transformación neoplásica de una célula da origen a la expresión de nuevos antígenos sobre la superficie celular, los cuales son reconocidos como extraños por el sistema inmunitario,^{12,76} cumpliéndose así la teoría de la “vigilancia inmunitaria” propuesta por Thomas y Burnet en 1957. Esta vigilancia inmunitaria ya se ha comprobado en varios modelos experimentales, ejemplificados por el crecimiento exitoso de xenotransplantes (incluyendo tumores humanos) en ratones desnudos, así como por el incremento en la aparición (1986).⁵⁸ Además de los mecanismos inmunológicos específicos mediados por linfocitos como respuesta al desarrollo de tumores, también se producen respuestas inmunológicas inespecíficas relacionadas con mecanismos de hipoxia tumoral y subsecuente necrobiosis e infiltrados de células inflamatorias leucocitarias, los cuales son bastante semejantes a los que ocurren en otros procesos inflamatorios.¹²² Con todo, este mecanismo de vigilancia inmunitaria no es perfecto y ello determina la aparición clínica de neoplasias, tal como ha sido publicado por Dunn *et al.*, 2002.³⁹

La respuesta inmune en los tumores malignos humanos está representada principalmente por los linfocitos T citotóxicos, generalmente CD8+, las células NK (células asesinas naturales) y diferentes tipos de citocinas.^{5,12,14,94,102,114} Muchos carcinomas y sarcomas expresan antígenos tumorales específicos que inducen una respuesta de las células T citotóxicas específicas, las cuales requieren dos señales distintas para su activación, de modo que si una de estas señales está ausente, las células T no reaccionan contra el tumor. Así mismo, otros mecanismos implicados en la alteración o retraso en la respuesta inmune están relacionados con la expresión anómala del complejo mayor de histocompatibilidad, con mutación de epítopes de la célula T y con mecanismos supresores.¹¹⁰

La aparición de clones tumorales evasivos de la inmunidad, que determinan el denominado proceso de inmunoedición del cáncer, determina la actuación de las células asesinas naturales (NK) -efectores potentes de inmunoedición- participando en la destrucción de células tumorales, bien directamente por exocitosis de gránulos citotóxicos, o bien indirectamente mediante la producción de interferón gamma, que activará las respuestas inmunes M1 y Th1. En relación con la participación de células NK en la vigilancia inmunológica y en la inmunoedición de los tumores malignos, la exposición a las células NK determina la modificación en la inmunogenicidad del cáncer, lo cual está relacionado con la supervivencia y la progresión del clon tumoral en un entorno inmunocompetente alterado.⁵⁷ Mingari *et al.*, 1997,¹⁰¹ trataron de explicar el mecanismo molecular por el cual las células NK son eficaces o fallan para lisar diferentes células tumorales; en este trabajo se encontraron receptores inhibitorios para MHC de clase I en los linfocitos T citolíticos y estos datos preliminares indicaban que la estimulación antigénica crónica pudiera determinar un déficit funcional de estos linfocitos. Es más, el hecho de que los linfocitos T citolíticos específicos puedan expresar simultáneamente receptores de células T y de NK (ambos reconociendo moléculas MHC de clase I, pero mediante señales opuestas) ofrecían una nueva perspectiva en la regulación de las respuestas de las células T.¹⁰¹

El crecimiento tumoral es, sin duda, una consecuencia del balance entre la respuesta inmune del huésped y la cinética del crecimiento tumoral. Existen estudios que señalan que si los antígenos tumorales no entran en cantidades suficientes a los tejidos linfoides organizados, no se induce una respuesta eficiente de los linfocitos T citotóxicos.¹¹⁰ Pero además, el escape tumoral de la vigilancia inmune puede estar relacionado con mecanismos de diferenciación de las células neoplásicas.⁵⁸ Las células tumorales han desarrollado múltiples mecanismos para escapar a la inmunovigilancia y crecer sin ser afectadas hasta matar a su huésped, sin embargo en la actualidad se desarrollan diversas estrategias para tratar de reconocer y destruir las células tumorales, entre las que se encuentran la inmunoterapia pasiva con anticuerpos marcados contra antígenos tumorales, inmunoterapia activa con células T activadas, así como vacunas de nuevo desarrollo, todas ellas encaminadas a incitar al sistema inmune a reconocer y destruir las células tumorales.⁹⁴

El concepto de inmunovigilancia de Burnet y Thomas se ha relacionado con un proceso más general de inmunoedición,³⁹ implicado en los mecanismos de eliminación de las células tumorales y en la determinación de los fenotipos inmunogénicos de tumores que se desarrollan en huéspedes inmunocompetentes; de este modo se podría facilitar el escape tumoral de la destrucción inmune. En estos procesos de destrucción de células tumorales participan las células natural killer (NK) -linfocitos CD56+ CD3- que constituyen un componente del sistema de inmunidad innata, y su actividad antitumoral viene determinada por mecanismos de reconocimiento y de lisis celular, por vía dependiente o independiente de la proteína perforina.¹⁴

En relación con el inmunofenotipo de las células inmunocompetentes asociadas a tumores, se sabe que en los tumores malignos frecuentemente hay infiltración de linfocitos y de otras células inmunocompetentes y estas células pueden tener un papel importante en el reconocimiento y la destrucción de las células neoplásicas.⁴¹ De hecho, un decremento en la actividad de los linfocitos que infiltran tumores sugiere que la habilidad del sistema inmune para controlar el crecimiento tumoral está fallando, favoreciendo la progresión del tumor.²¹

Los linfocitos que infiltran tumores malignos son, en su mayor parte, linfocitos T y macrófagos, con unos pocos linfocitos B.^{10,97} La presencia de linfocitos T y macrófagos implica el desarrollo de mecanismos complejos para la interacción celular inducida por las células neoplásicas,^{10,111} además existe una relación entre la infiltración de linfocitos CD3+ y el desarrollo de angiogénesis inducida por la expresión de VEGF en las células tumorales y en los linfocitos asociados al tumor,⁵⁰ y estos mecanismo de angiogénesis en tumores malignos están regulados por la activación de proteinkinasas.¹¹⁷

Las células T desempeñan un papel crítico en el reclutamiento, la activación y la regulación de muchos aspectos de la respuesta inmune adaptativa, con sus funciones de cooperación con las células B y las células T citotóxicas CD8+. Las células T CD4 + también influyen en la inmunidad innata por ayudar a formar el carácter y la magnitud de la respuesta inflamatoria, lo que sugiere que son un elemento importante, cuya presencia en el

tumor es un factor pronóstico.⁵⁹ Además, los linfocitos T que infiltran tumores malignos expresan factores paracrinicos reguladores de la angiogénesis.⁵⁰

La valoración del infiltrado linfocitario en los diferentes tumores ha sido motivo de abundantes estudios de investigación;^{21,53,131,136} y la presencia e inmunofenotipo de las células inmunocompetentes han sido especialmente evaluadas en los siguientes tipos de tumores: cáncer de mama^{3,10,23,33,38,145} -incluyendo la variedad medular-⁵¹, carcinoma de células renales, melanoma, sarcomas, el cáncer de colon,^{10,145} tumores germinales testiculares,¹⁴¹ tumores de pulmón,¹⁴⁵ ovario,^{143,145} carcinomas de tiroides,¹⁴⁵ carcinomas de piel,¹ carcinomas de próstata.⁹⁹ En toda esta amplia variedad de tumores malignos se han demostrado una mayor proporción de linfocitos CD3+ y CD4+ que de linfocitos CD8+; estos datos sugieren el importante papel de la inmunidad celular mediada por los linfocitos T en la defensa contra los tumores.

Los carcinomas medulares de mama tienen un prominente infiltrado linfoide, y en su mayoría son células T CD45 RO+/CD3+, siendo su inmunofenotipo CD3+/CD4+ en el 36% de los casos y CD3+/CD4- en el 64% de los casos, pero no se han detectado células natural killers (CD57+) e histiocitos (MAC387+). Sin embargo, no se ha encontrado relación entre el número y tipo de células T con el número de metástasis en ganglios linfáticos axilares y con la supervivencia, tampoco se vio relación con la presencia del virus de Epstein-Barr.⁵¹ En el cáncer de mama, si bien tradicionalmente se ha considerado a los linfocitos citotóxicos CD8+ como un componente clave en la inmunidad antitumoral efectiva y que los tumores de mama con altos niveles de células T CD8+ se han asociado a una mejor sobrevida, hay estudios recientes que demuestran que estas células T CD8+ frecuentemente fallan funcionalmente, si faltan las células T cooperadoras CD4+.⁵⁹

En los carcinomas de próstata, la terapia ablativa de andrógenos induce la infiltración difusa de linfocitos T, principalmente linfocitos CD4+ y en menor cantidad CD8+.⁹⁹ De otra parte, en cáncer de ovario, la infiltración de linfocitos CD8+ se correlaciona solo parcialmente con otros datos clínicos y patológicos de valor pronóstico.⁷

En definitiva, en la actualidad son muchos y muy importantes los avances en el diagnóstico y tratamiento inmunoterápico de las neoplasias malignas, surgiendo investigaciones fronterizas en el uso de biomarcadores de linfocitos como candidatos a tener un valor pronóstico de muchas neoplasias;¹⁵⁶ además, es posible que la respuesta inmune asociada al desarrollo de neoplasias malignas pueda participar en el microambiente tumoral, lo cual recientemente se ha estudiado mediante imágenes intravitales, con el fin de conocer cómo los linfocitos T citotóxicos específicos pueden matar células que expresan antígenos tumorales, y también visualizar las interacciones intercelulares entre las células tumorales y los linfocitos T citotóxicos-tumor específicos, con las células T tumor específicas reguladoras, y con los macrófagos y otras células inmunocompetentes asociadas al tumor.¹¹⁴

TUMORES DE GLÁNDULAS SALIVARES

Los tumores de glándulas salivares constituyen unas neoplasias morfológicamente diversas y se reconocen alrededor de 40 entidades diferentes.^{40,54} Los tipos histológicos más frecuentes de tumores malignos de glándulas salivares mayores son los carcinomas mucoepidermoides y los carcinomas adenoide quísticos, mientras que el tumor benigno más frecuente es el adenoma pleomórfico (tumor mixto). Todos los tipos histológicos que se presentan en las glándulas salivares mayores también se pueden diagnosticar en las glándulas salivares menores asociadas a la cavidad oral y al árbol tráqueo-bronquial,^{108,109,150} siendo los patrones histopatológicos semejantes a sus homónimos de las glándulas salivares mayores.

Los tumores salivares son relativamente poco frecuentes, con una incidencia global de 2.5 a 3 por 100.000 al año. Más del 90% corresponden a neoplasias epiteliales, les corresponde menos del 2% de los tumores en el ser humano y son más frecuentes en adultos, con un leve predominio en mujeres. El 5% aparecen en niños menores de 16 años, pero en estos niños el 50% de los tumores de glándulas salivares son malignos, contra el 10 a 25% en adultos;¹³⁷ es más, a partir de la segunda década se incrementa la frecuencia de los malignos, como son el carcinoma mucoepidermoide y el carcinoma de células acinares; con todo, el adenoma pleomórfico es el tumor epitelial más común en la infancia.⁸⁹

La localización anatómica por frecuencia es: parótida: 65 a 80% de los tumores de las glándulas salivares, submaxilar: 10%, sublingual y glándulas salivares menores: 10 a 25%.^{76,146} Es importante destacar que el 70 a 90% de los tumores sublinguales son malignos, el 50% de los tumores de glándulas salivares menores son malignos, el 40% de los tumores submaxilares son malignos y, en cambio, solo el 15 a 30% de los tumores parotídeos son malignos.^{24,76,120} De hecho, en las glándulas salivares los tumores benignos (80%) son mucho más frecuentes que los malignos.¹³² Generalmente los tumores parotídeos benignos son los que más se correlacionan con el diagnóstico clínico, no así los extrapatotídeos.⁸² Si bien la mayoría de las neoplasias benignas y malignas derivan de una sola célula progenitora, los tumores de las glándulas salivares pueden mostrar una diferenciación divergente, dando origen a diferenciación de varios tipos celulares, como ocurre en el tumor mixto o adenoma pleomórfico. Isacson y Shear, 1983,⁶⁹ reportan un estudio de 201 casos de tumores salivares intraorales, de los cuales el 72.5% se clasificaron como benignos (principalmente adenomas pleomórficos) y el 27.5% fueron malignos, siendo el tumor maligno más frecuente el carcinoma adenoideo quístico.⁶⁹ El pronóstico más favorable corresponde a aquellos tumores bien diferenciados (carcinoma mucoepidermoide o al carcinoma de células acinares) y al carcinoma adenoideo quístico de tipo tubular; mientras que, son de peor pronóstico el carcinoma originado en un adenoma pleomórfico y los carcinomas indiferenciados.²⁴

Dioguardi *et al.*, 2013,³⁵ estudiaron 220 pacientes con sialometaplasia necrotizante, una enfermedad benigna reactiva, asociándose en 6 casos tumores. En pacientes con SIDA, Shebl *et al.*, 2010,¹²⁵ estudiaron 39 casos de carcinomas nasofaríngeos y encontraron un mayor riesgo de carcinomas de glándulas salivares y nasofaríngeos, sugiriendo que la inmunosupresión o infecciones virales oncogénicas tienen un papel importante en su etiología.

CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES DE GLÁNDULAS SALIVARES

La clasificación de los tumores de las glándulas salivares es compleja y, de acuerdo a la última revisión de la OMS, comprende tumores benignos y tumores malignos de origen epitelial (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de la OMS 2005 de los tumores epiteliales de glándulas salivares.

Neoplasias Epiteliales Malignas	Tumores Epiteliales Benignos	Tumores de Tejidos Blandos
Carcinoma de células acinares	Adenoma pleomórfico	Hemangioma
Carcinoma mucoepidermoide	Mioepitelioma	Tumores hematolinfoides
Carcinoma adenoideo quístico	Adenoma de células basales	
Adenocarcinoma polimorfo de bajo grado		Linfoma de Hodgkin
Carcinoma epitelial-mioepitelial	Tumor de Warthin	Linfoma difuso de células grandes tipo B
Carcinoma de células claras sin otra especificación	Oncocitoma	
Adenocarcinoma de células basales	Adenoma canalicular	Linfoma extranodal de la zona marginal de células B
Carcinoma sebáceo	Adenoma sebáceo	
Linfadenocarcinoma sebáceo	Linfadenoma	
Cistadenocarcinoma	Papiloma ductal sebáceo/no-sebáceo	Tumores secundarios
Cistadenocarcinoma cribiforme de bajo grado		
Adenocarcinoma mucinoso	Papiloma ductal invertido	
Carcinoma oncocítico		
Carcinoma de ductos salivales	Papiloma intraductal	
Adenocarcinoma sin otra especificación	Sialadenoma papilifero	
Carcinoma mioepitelial	Cistadenoma	
Carcinoma ex – adenoma pleomórfico		
Carcinoma		
Adenoma pleomórfico metastatizante		
Carcinoma de células escamosas		
Carcinoma de células pequeñas		
Carcinoma de células grandes		
Carcinoma linfoepitelial		
Sialoblastoma		

Las neoplasias no epiteliales son poco frecuentes y representan el 2 a 5% de los tumores de glándulas salivares, entre los que se encuentran los tumores metastásicos, los cuales son más frecuentes en la glándula parótida, sobre todo las metástasis de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello. El último fascículo del Atlas de Patología Tumoral de Tumores de Glándulas Salivares del Instituto de las Fuerzas Armadas (AFIP) considera once tipos de tumores epiteliales benignos y 23 variedades de tumores epiteliales malignos, de otra parte, las neoplasias mesenquimales las clasifica en benignas y malignas; esta clasificación también incluye los linfomas malignos, tumores secundarios (metastásicos) y condiciones pseudotumorales, y, por último, agrega entre los tumores benignos al papiloma ductal invertido y al sialadenoma papilífero como entidades propias, y entre los tumores malignos agrega al carcinoma adenoescamoso.⁴²

Tumores Benignos

El adenoma pleomórfico, también llamado tumor mixto, es el tumor más frecuente de las glándulas salivares (45-74% de todos los tumores salivares y el 66% de los tumores benignos); sin embargo, es poco frecuente en glándulas salivares menores. El adenoma pleomórfico se caracteriza por tener diferenciación epitelial y mesenquimatoso. Se origina en las células ductales o mioepiteliales. Clínicamente son masas redondeadas, bien delimitadas, pseudoencapsuladas con proyecciones. Al corte son sólidos de color blanco grisáceo con áreas mixoides y condroides. Histológicamente forman ductos y tienen células mioepiteliales y el estroma con una matriz mesenquimatoso mixoide con islotes condroides y a veces hueso. Pueden recidivar, incluso en el 25% de los casos.⁴² Expresan el denominado gen 1 del adenoma pleomórfico (PLAG 1), positivo en el 94.4% de los adenomas pleomórficos, aunque también se encuentra en el 100% de todos los mioepiteliomas, en el 25% de los adenocarcinomas polimorfos de bajo grado y en casos de carcinomas ex-adenoma pleomórfico.¹¹⁸

El tumor de Warthin es la segunda neoplasia más frecuente de las glándulas salivares (4-25% de los casos). En los registros de la AFIP le corresponde el 3% de todos los tumores epiteliales y el 5.2% de todos los tumores parotídeos, ya que es casi exclusivo de la glándula parótida. El 10% de los casos son multifocales, en un 10% son bilaterales. Histológicamente

muestran espacios con proyecciones papilares revestidos por una doble capa de células epiteliales, cilíndricas, altas y oncocíticas de citoplasma acidófilo, sobre un estroma linfoide con centros germinales. Su tratamiento es la resección quirúrgica. En el 2% de los casos ocurre recidiva tumoral posterior a la cirugía.⁴²

El adenoma de células basales es una neoplasia epitelial benigna con células basaloides; le corresponden al 3% de todos los tumores epiteliales primarios de glándulas salivares, el 80% se presentan en la parótida y el 3.5% en la submaxilar. En los registros de la AFIP le corresponden el 2.5% de todos los tumores epiteliales benignos de glándulas salivares. Microscópicamente puede presentar los siguientes patrones: sólido, trabecular, tubular, membranoso y de tipo análogo dérmico. El pronóstico es bueno y su recurrencia es baja.⁴²

El mioepitelioma es un tumor benigno epitelial y representa el 1.5% de todos los tumores de glándulas salivares. Histológicamente está compuesto por láminas o nidos de células de diferentes aspectos: células fusiformes, plasmocitoides, epitelioides y claras. Se caracteriza por su diferenciación mioepitelial, sin evidencia de diferenciación ductal, además puede tener abundante estroma acelular, mucoide o hialinizado.⁴²

Tumores Malignos

Carcinoma Mucoepidermoide

El carcinoma mucoepidermoide es el tumor maligno más frecuente en las glándulas salivares (30% de los casos) y está compuesto por células mucosas, epidermoides, intermedias, columnares, claras y ocasionalmente oncocíticas. El 53% de los carcinomas mucoepidermoides se presentan en las glándulas salivares mayores, el 45% ocurren en la parótida, y el 21% en las glándulas salivares menores del paladar. Es más frecuente en mujeres (60.2%) y es el tumor maligno más frecuente en niños (el 7% ocurren en la 2ª década de la vida). Clínicamente se presenta como una masa solitaria no dolorosa, aunque dos tercios de los pacientes son asintomáticos, los síntomas incluyen parálisis facial, malestar, dolor, trismos y disfagia. Histológicamente se gradúan en tumores de bajo grado, de grados intermedio y alto grado (Tabla 2). En general los tumores de bajo grado tienen

más espacios quísticos, mitosis poco frecuentes y escasa atipia. Los de grado intermedio son más celulares, tienen anaplasia y los espacios quísticos comprenden menos del 20% del tumor. Los carcinomas mucoepidermoides de alto grado son más sólidos, anaplásicos, con necrosis, invasión neural y tienen 4 o más mitosis por cada 10 campos a gran aumento.⁴² Estudios citológicos mediante punción con aguja fina permiten identificar células mucosas, mucina extracelular, células intermedias, linfocitos, células con citoplasma espumoso, oncocitos y células queratinizadas.¹⁵² Se ha descrito una variante esclerosante del carcinoma mucoepidermoide, caracterizada por intensa esclerosis central e infiltrado inflamatorio de células plasmáticas linfocitos y eosinófilos,⁴⁴ identificándose en esta variante esclerosante la presencia de células plasmáticas IgG4, lo que sugiere un papel en la fibrogénesis de este tumor.¹³⁸

Tabla 2. Sistema de graduación del carcinoma mucoepidermoide.

Descripción		Puntuación
Componente intraquístico menor del 20%:		+2
Presencia de invasión neural:		+2
Presencia de necrosis:		+3
4 o más mitosis por 10 campos a seco fuerte:		+3
Anaplasia:		+4
Graduación	Bajo Grado:	0 a 4 puntos
	Grado Intermedio:	5 a 6 puntos
	Grado alto:	7 o más puntos

En los carcinomas mucoepidermoides, las células intermedias, columnares y epidermoides son positivas para citokeratina; sin embargo, las células claras tienen reactividad variable y las células mucosas bien desarrolladas son negativas. La mayoría de las células son positivas para antígeno epitelial de membrana; no obstante es variable la expresión de actina de músculo liso específico, vimentina y proteína S-100. Con todo,

aunque la alfa-fetoproteína se expresa más en los tumores de alto grado, los estudios inmunohistoquímicos no se correlaciona con el grado tumoral.

Carcinoma de Células Acinares

Los carcinomas de células acinares están formados por una proliferación de células acinares serosas. Es la segunda neoplasia epitelial maligna más frecuente (17%) y el 80% se desarrollan en la parótida, es más habitual en mujeres entre la 2ª a la 7ª décadas y suele ser bilateral. Microscópicamente los carcinomas de células acinares están constituidos por láminas y cordones de células de citoplasma granular, basófilo y uniforme, siendo sus núcleos redondos y excéntricos; se han descrito variantes histológicas: de células claras, papilar, folicular y microquística. Inmunohistoquímicamente son positivos para citokeratinas, transferrina, lactoferrina, alfa 1-antitripsina, alfa 1-antiquimotripsina, CEA y amilasa. Los carcinomas de células acinares son neoplasias malignas de bajo grado y su histomorfología no predice su evolución biológica. Los carcinomas acinares que se originan en las glándulas salivares menores son menos agresivos que los originados en las mayores. Algunos casos pueden recidivar y desarrollar metástasis ganglionares, pero su mortalidad es muy baja.¹⁰⁶

Carcinoma Adenoide Quístico

El carcinoma adenoide quístico es un tumor epitelial maligno de células diferenciadas mioepiteliales (abluminales) y ductales (luminales). Es la cuarta neoplasia maligna más frecuente de glándulas salivares, después del carcinoma mucoepidermoide, el adenocarcinoma NOS y el carcinoma de células acinares (10% de todos los carcinomas salivares). Aunque la parótida es la localización más frecuente, casi la mitad ocurren en las glándulas salivares menores, principalmente en el paladar. Macroscópicamente son masas firmes, blanco-grisáceas, bien delimitados, pero no encapsuladas. Existen tres variedades histológicas.^{42,132}

- *Tipo cribiforme*, el 50% de todos los casos, constituido por nidos de células epiteliales, las luces tienen secreción PAS+, algunas veces la secreción es mucohialina o hialina.

- *Tipo tubular*, el 30 % de todos los casos, formado por cordones celulares, acompañados por un estroma hialino, sus luces están revestidas por células epiteliales cuboideas estratificadas. Puede tener pequeñas áreas cribiformes.
- *Tipo sólido o basaloide*, 20% de todos los casos, formado por estructuras sólidas, con células epiteliales cuboideas de citoplasma basófilo, núcleo oscuro y cromatina granular, puede presentar áreas cribiformes. El desarrollo de metástasis es más frecuente en este tipo sólido de carcinoma adenoide quístico.¹³³

En los carcinomas adenoides quísticos los marcadores de actividad proliferativa (MIB1 -Ki-67) pueden ayudar a establecer el pronóstico, además, la expresión de la oncoproteína p53 puede ser un marcador pronóstico adverso (se ha detectado más frecuentemente en recurrencias que en tumores primarios); por último, los paciente con afectación ósea y con metástasis pulmonares tienen un peor pronóstico que aquellos que solo tienen metástasis pulmonares.¹³³ Inmunohistoquímicamente, el empleo del marcador CD117 puede ser de utilidad para diferenciar el carcinoma adenoide quístico del adenocarcinoma polimorfo de bajo grado.

Carcinoma Epitelial Mioepitelial

El carcinoma epitelial-mioepitelial es una neoplasia epitelial maligna de bajo grado, de composición celular bifásica, constituido por células ductales lumbinales, rodeadas por células mioepiteliales ablumbinales, las cuales son muy abundantes.¹¹⁹ Este tipo de tumor solo representa el 2% de las neoplasias epitaliales salivares malignas. Es un tumor predominante de glándulas salivares mayores (parótida), solo el 10 a 15% se desarrolla en las glándulas salivares menores. Es principalmente un tumor de adultos en la sexta y séptima décadas de la vida. Son tumores bien delimitados, a veces hemorrágicos o necróticos. Histológicamente se distinguen los patrones sólido, tubular, papilar y quístico. Las células epiteliales ductales son positivas para citokeratina y antígeno epitelial de membrana y las células mioepitelales tienen expresión de actina, de músculo liso, proteína S-100 y calponina. Algunos casos se transforman en carcinomas de alto grado, con células pleomórficas, fusiformes, claras, así como diferenciación escamosa, pero mantienen la positividad para Keratina, CAM 5.2, antígeno de membrana epitelial, calponina, CK 5-6 y p63.⁴²

Adenocarcinoma Polimorfo de Bajo Grado

El adenocarcinoma polimorfo de bajo grado es una neoplasia epitelial maligna que generalmente se localiza en las glándulas salivares menores y se caracteriza por una morfología nuclear uniforme y regular, arquitectura diversa, crecimiento infiltrativo y prominente neurotropismo. Representa el 11% de todos los tumores de las glándulas salivares menores y el 26% de los malignos. El 60% de los casos se localizan en la mucosa del paladar (duro y blando), el 16% en la mucosa oral, y el 12% en el labio. El 70% ocurren en personas entre 50 y 79 años. Macroscópicamente son tumores ovoides, bien delimitados pero no encapsulados. La mucosa que lo cubre raramente se ulcera. Microscópicamente posee diferentes patrones de crecimiento, particularmente agresivo es el patrón papilar, siendo frecuente la afección perineural. Las células proliferantes son monomorfas cúbicas o columnares, con núcleos basófilos elongados u ovaes, citoplasma escaso eosinófilo o basófilo, las mitosis y áreas de necrosis son poco frecuentes. Los patrones de crecimiento predominantes son: sólido, trabecular, ductal y tubular, pero también puede haber áreas con patrón cribiforme, quístico y papilar. En general están constituidos por pequeñas estructuras tubulares con luces centrales limitadas por una sola capa de células cuboidales, o por nidos. El pronóstico de los adenocarcinomas polimorfos de bajo grado depende del tamaño y la localización, pero tiene un 17% de recurrencia y 9% de metástasis. El-Nagdy *et al.*, 2013,⁴³ estudiaron 20 tumores, 8 adenocarcinomas polimorfos de bajo grado y 12 carcinomas adenoideoquísticos, todos intraorales, y encontraron mayor expresión de CD117 (c-kit) y galectina 3 en las variantes sólidas del carcinoma adenoideo quístico; sus resultados estadísticos apoyan que las células neoplásicas expresan citoqueratina, vimentina, actina músculo específica, antígeno epitelial de membrana, CEA y Proteína ácida gliofibrilar. Con el fin de poder diferenciar el adenocarcinoma polimorfo de bajo grado del carcinoma adenoideo quístico se ha sugerido el alto valor diagnóstico del c-kit pero no de la galectina-3, y además se está investigando el papel de los inhibidores de c-kit en el tratamiento de los pacientes con carcinoma adenoide quístico.⁴³

Tabla 3. PTNM en tumores de glándulas salivares (College of American Pathologists, 2011).²⁸

PTMN en Tumores de Glándulas Salivares	
Tamaño/extensión tumoral	pTX: El tumor primario no se puede establecer
	pT0: No hay evidencia del tumor primario
	pT1: Tumor de 2 cm o menos en su diámetro mayor, sin extensión extraparenquimatosa
	pT2: Tumor mayor de 2 cm pero no mayor de 4 cm, sin extensión extraparenquimatosa
	pT3: Tumor mayor de 4 cm o con extensión extraparenquimatosa
	pT4a: Enfermedad moderadamente avanzada: Tumor invade piel, mandíbula, conducto auditivo o nervio facial
	pT4b: Enfermedad localmente muy avanzada: Tumor invade los huesos de la base del cráneo, placas pterigoideas o rodea la carótida
	m: Múltiples primarios
	r: Recurrencia
	y: Post-tratamiento
Estado de los ganglios linfáticos regionales	pNX: No está establecido
	pN0: No metástasis en ganglios linfáticos regionales
	pN1: Metástasis a un ganglio linfático ipsilateral de 3 cm o menos en su diámetro mayor
	pN2a: Metástasis a un ganglio ipsilateral mayor de 3 cm pero no mayor de 6 en su diámetro mayo
	pN2b: Metástasis en múltiples ganglios ipsilaterales, ninguno mayor de 6 cm
	pN2c: Metástasis en ganglios bilaterales o contralaterales, ninguno mayor de 6 cm
	pN3: Metástasis en ganglio linfático mayor de 6 cm
MD	pM1: Metástasis distantes
Estadios (Guzzo M. <i>et al.</i> , 2010) ⁶⁰	Estadio I: T1, N0, M0
	Estadio II: T2, N0, M0
	Estadio III: T3, N0, M0 / T1, T2, T3, N1, M0
	Estadio IVA: T1, T2, T3, N2, M0 / T4a, N0, N1, N2, M0
	Estadio IVB: T4b, cualquier N, M0, cualquier T, N3, M0
	Estadio IVC: Cualquier T, cualquier N, M1.

MD: Metástasis a distancia

PATOLOGÍA MOLECULAR DE LOS TUMORES DE GLÁNDULAS SALIVARES

La Patología Molecular ha permitido un avance fundamental en el conocimiento de los mecanismos íntimos de las lesiones fundamentales, siendo de especial relevancia sus aportaciones al estudio del cáncer.⁶³ Está bien establecido que el desarrollo de neoplasias es el resultado de múltiples factores –radiaciones, agentes químicos, infecciones, factores genéticos- que pueden producir alteraciones celulares y una proliferación celular anormal.^{12,88,98} Hoy sabemos que aproximadamente el 10% de los tumores humanos se asocian a virus.^{16,153} En la actualidad sabemos que el desarrollo del cáncer es un proceso multifactorial en el que participan cambios genéticos, mutaciones, alteraciones estructurales y numéricas de los cromosomas, así como la pérdida de la capacidad para reparar los daños en su ADN, que resulta en una expresión génica aberrante. Está claro que el desarrollo del cáncer no es un evento fortuito, único o aislado, se encuentra precedido por una serie de cambios genéticos o ambientales que están determinando un incremento importante del desarrollo de cáncer; así en los Estados Unidos de Norte América, más de un millón de personas descubren cada año que padecen algún tipo de cáncer, en 1998 el cáncer produjo 564.000 defunciones, que equivalen al 23% de la mortalidad total.⁷⁹ Para el año 2013 se esperan 1.660.290 nuevos casos y 580.350 muertes por cáncer.¹²⁸

Con todo, el desarrollo de los tumores malignos en humanos es un proceso lento y complejo que requiere la participación de múltiples alteraciones genéticas, activación de oncogenes, inhibición de genes supresores tumorales -cuya función normal desaparece en las células tumorales- e inhibición de la apoptosis.^{13,17,113} Cada célula de nuestro cuerpo posee una limitada capacidad replicativa, lo cual está determinado por los telómeros, situados en los extremos de los cromosomas. Los telómeros evitan la pérdida de material genético durante la replicación y limitan la capacidad replicativa de las células, ya que se van acortando con cada división celular; además, se sabe que el envejecimiento de las células está relacionado con la longitud del telómero, de modo que si añadimos telomerasa (enzima que alarga el telómero) la célula se reproduce indefinidamente. La telomerasa se encuentra normalmente en pocos tipos celulares humanos (células germinales, células madre y células inmunes), pero la telomerasa está presente en el 90% de los tumores malignos humanos.^{4,18,565} Kyo *et al.*, 2000,⁷⁸ proponen utilizar la determinación de la actividad de la

telomerasa como un blanco terapéutico, ya que la detección de la transcriptasa reversa de la telomerasa humana, responsable de la actividad enzimática de la telomerasa, es de utilidad en el diagnóstico de cáncer.

Existen múltiples estudios que investigan la presencia de marcadores moleculares en los tumores benignos y malignos de las glándulas salivares,^{46,85} incluyendo la expresión de diferentes proteínas, glicoproteínas, citocinas, oncogenes y factores de proliferación celular. Recientemente se han encontrado hallazgos muy interesantes, entre otros, la pérdida de la alfa 6 y alfa v integrina (receptores de la matriz extracelular) en los carcinomas, lo que sugiere que hay una pérdida de las propiedades de adhesión en las células tumorales que facilita su diseminación.⁴⁹ También se ha visto que la expresión de MUC 1 y MUC 2 en tumores de glándulas salivares puede ser de valor para su clasificación.⁹²

En los tumores de glándulas salivares, Frade *et al.*, 2001⁴⁸ estudiaron la proliferación celular en 39 casos, mediante MIB-1, obteniendo que el índice de proliferación de los tumores benignos (menos del 5%) fue significativamente más bajo (17.8%) que en los malignos.⁴⁸ Sin embargo, con respecto al pronóstico, la comparación de los datos de ploidía del ADN, mediante citometría de flujo, y el índice de células Mib1+, en general no muestra correlaciones, salvo en los carcinomas de células acinares, en los que hay una correlación entre el Mib1 y el pronóstico.¹³⁴ También la ploidía, incluyendo la evaluación de la fase S y la tasa de exceso de 5c, por citometría de imagen, de los tumores salivares se cotejó con la citoarquitectura tumoral, mediante la expresión de tres proteínas: e-cadherina, laminina, y CD44; de este modo se intentó correlacionar el grado de integridad estructural y el grado histológico y la agresividad de los tumores malignos, con el fin de predecir la conducta biológica de las lesiones malignas de glándulas salivares.⁹

El estudio de la angiogénesis en los tumores malignos de glándulas salivares tiene singular importancia; en este sentido, se ha evaluado la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la densidad microvascular en 20 tumores benignos y 25 malignos de glándulas salivares, encontrándose una expresión del VEGF significativamente mayor en los tumores malignos que en los benignos.⁴⁵

De otra parte, en una serie de 50 tumores salivares se ha encontrado que la expresión de Bcl-2 es más intensa en los tumores malignos que en los benignos, lo que sugiere una alta tasa de supervivencia de las células tumorales en las neoplasias malignas salivares.⁹¹

Gandour-Edwards *et al.*, 1995⁵² estudiaron la localización inmunohistoquímica de IL-6 en 57 tumores salivares y sus resultados sugirieron una relación inversa entre la presencia de IL-6 y la agresividad biológica del tumor.⁵² La expresión de beta defensina 2 (HBD-2) en tumores benignos y malignos de glándulas salivares es significativamente mayor en los tumores salivares benignos y en los casos de sialoadenitis, con respecto a los tumores malignos salivares. Además, la expresión de alfa defensinas 1, 3 y 4 en sialoadenitis⁷¹ y en diferentes tumores de glándulas salivares están elevadas en todos los tumores, excepto en los casos de adenoma pleomórfico; estos datos permiten sugerir que una disminución en la expresión de las alfa defensinas 1, 3 y 4 pueden proteger a los adenomas pleomórficos de su transformación maligna.¹⁵⁷

La osteopontina, una proteína que participa en la mineralización ósea, también se ha relacionado con la génesis tumoral y la metástasis en varios modelos animales experimentales y en cánceres humanos. En tumores de glándulas salivares, la expresión de osteopontina, CD44 e integrina $\alpha\beta 3$ está aumentada, sobre todo en los adenocarcinomas polimorfos de bajo grado y en el carcinoma adenoideo quístico; sin embargo no se ha encontrado correlación de la expresión de osteopontina con la de CD44 e integrina $\alpha\beta 3$.⁴⁷

La nestina, filamento intermedio inicialmente identificado en células progenitoras neurales, se exploró en los tumores salivares, obteniéndose intensa expresión en las células abluminales de los siguientes tipos de tumores: adenomas pleomórficos, adenomas de células basales y carcinomas epitelial-mioepitelial; además la nestina fue focalmente positiva en casos de carcinoma adenoideo quístico y en el adenocarcinoma polimorfo de bajo grado; pero no se detectó en casos diagnosticados de tumor de Warthin, carcinoma de células acinares, carcinoma mucoepidermoide, ni en carcinoma ductal salivar; todos estos datos sugieren que la nestina pudiera ser un marcador de utilidad en el diagnóstico de algunos tumores de glándulas salivares.¹⁵⁹

Con el fin de encontrar dianas terapéuticas, en los tumores malignos de glándulas salivares se han realizado numerosos estudios moleculares e inmunohistoquímicos. Así, se han encontrado altos niveles de Her-2 y receptores de estrógenos, progesterona y andrógenos en tumores malignos de glándulas salivares,⁵⁵ incluidos los carcinomas salivares ductales, C-kit en carcinomas mioepiteliales y EGFR en carcinomas mucoepidermoides. Con respecto a la proteína c-Kit, un receptor tipo tirosin kinasa, se sabe que las mutaciones de ganancia de función en el exón 11 y en el exón 17 indican un mecanismo de activación de c-kit en algunos tumores. Jeng *et al.*, 2013,⁷⁰ estudiaron la expresión de c-kit en 79 carcinomas de las glándulas salivales mayores y menores, obteniéndose una positividad en la mayoría de casos de carcinomas adenoideo quísticos, carcinomas linfoepiteliales y en carcinomas mioepiteliales, pero fue negativo en otros carcinomas salivares; todos estos datos sugieren que la sobre-expresión de la proteína c-kit participa en la patogénesis de ciertos tipos de carcinomas salivares; sin embargo, los mecanismo de activación de c-kit no dependen de mutaciones del gen, ya que en estos casos la secuenciación del ADN no identificó la alteración genética en los exones 11 y 17.⁷⁰ Tampoco GATA 3 (positivo en el 90% de los carcinomas de mama y en los uroteliomas) es un marcador molecular discriminante en los tumores malignos salivares, dado que solamente se expresa en el 43% de los casos.¹⁰⁰

En un amplio estudio molecular, explorando 21 antígenos tumorales relacionados con factores pronóstico, en 158 tumores benignos y malignos de glándulas salivares se ha encontrado que los epitopes ACE, Cox-1, Cox-2, Sigma, beta-Catenina, WISP-1 y PDGF-beta se regulan de modo diferente en tumores parotídeos benignos y malignos, lo que permite proponer una calificación de estas moléculas, con el fin de diferenciar los tumores benignos de los malignos.¹²³ De otra parte, en tumores con componente mioepitelial se han detectado mutaciones recurrentes que implican elementos bajos de la vía del EGFR en HRAS y en otros oncogenes clave. Sin embargo, los resultados de genotipificación muestran que la activación baja del EGFR solo ocurre en 18 de 107 pacientes, lo que podría explicar la baja eficacia de los inhibidores de EGFR en estos tumores salivares.³⁰

En los tumores malignos salivares es interesante señalar que la expresión de receptores hormonales para andrógenos, estrógenos y progesterona podría tener un posible papel en el manejo clínico de estos tumores, sobre todo el receptor de andrógenos.¹⁰⁷

Otros marcadores moleculares de valor diagnóstico y pronóstico en los tumores salivares son la expresión de la proteína asociada al gen Bcl-2 (inhibidor de la apoptosis) encontrada en tumores benignos y malignos;^{62,160} la presencia de Ki-67, como un indicador de la conducta biológica del tumor,¹⁰⁵ y otros muchos factores como la oncoproteína c-erbB-2,⁷⁴ interleucina-6,⁵² colágeno IV y tenascina,^{72,130} así como la expresión de MIB 1 y PCNA,¹²⁹ cathepsina-D y el antígeno DF3.¹⁴⁹ Así mismo, la realización de estudios citogenéticos que han demostrado cariotipos anormales, tanto en tumores malignos como benignos, pueden relacionarse con la agresividad de los tumores salivares.⁹⁵

Recientemente se han descubierto translocaciones y fusión de oncogenes que permiten precisar el diagnóstico de determinados tipos de tumores salivares, particularmente en adenoma pleomórfico, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoide quístico, carcinoma secretorio análogo al mamario y carcinoma hialinizante de células claras; de este modo los datos moleculares, incluidos los de proteómica,³⁷ determinarán futuras modificaciones de la clasificación de los tumores de glándulas salivares.¹⁵⁵

En definitiva, la investigación de marcadores moleculares y su inmunofenotipo de células inmunocompetentes en los tumores salivares son de especial relevancia, no solo en relación a la evolución clínica de estos tumores, sino también en el conocimiento de los mecanismos moleculares que participan en la progresión -y posiblemente en el pronóstico- de los diferentes tipos de tumores salivares. En este sentido, Villano Bonamin *et al.*, 2001,¹⁵¹ exploraron la posible relación entre factores glandulares salivares, crecimiento tumoral y leucocitos infiltrando el tumor, sugiriendo que los factores de crecimiento pueden modular la infiltración leucocitaria, así como la tasa de crecimiento tumoral.¹⁵¹ En el cáncer de cabeza y cuello, incluidos carcinomas salivares, la infiltración linfocítica alrededor del tumor se correlaciona con el número de linfocitos en sangre periférica.¹⁴⁷ Se sabe que los infiltrados

por linfocitos son frecuentes en los carcinomas escamosos orales, lo cual puede relacionarse con la citotoxicidad anti-tumoral específica.⁸³

Con respecto a los tumores de glándulas salivares, si bien un alto porcentaje de enfermedades salivares neoplásicas y no neoplásicas tienen un componente linfoide muy prominente, en algunas de ellas -tumor de Warthin, linfadenoma sebáceo y carcinoma linfoepitelial- la presencia de infiltrados linfoides son un elemento requerido para el diagnóstico.⁶ Sin embargo, en la literatura solo se han encontrado trabajos muy preliminares y parciales en los que describen la presencia de infiltrados linfoides en algunos casos de tumores malignos de cabeza y cuello,^{2,11,15,25,36,103,140,153,154,161} incluidos algunos casos de tumores malignos de glándulas salivares. Por ejemplo, en el pulmón se han constatado casos de carcinoma mucoepidermoide de bajo grado¹¹⁶ y algunos casos con abundante proliferación linfoide, los cuales son semejantes a algunos carcinomas mucoepidermoides de glándulas salivares;¹²⁶ de otra parte, también se ha dicho que la expresión del gen alfa defensina (relacionada con linfocitos T) protege a los adenomas pleomórficos de su transformación maligna,¹⁵⁷ no habiéndose encontrado más trabajos de este tema. Sin duda, está claro, que todos estos estudios de infiltrados linfoides asociados a tumores salivares son muy parciales y poco conclusivos.

Toda la amplia revisión de la literatura acerca de los tumores malignos de glándulas salivares permite corroborar la novedad del presente estudio de Tesis Doctoral, dado que no existen publicaciones previas centradas en el inmunomarcaje y estudio cuantitativo de los diferentes fenotipos de células inmunocompetentes en los distintos tipos histológicos de tumores malignos de glándulas salivares.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

¿El perfil de células inmunocompetentes de los diferentes tipos histológicos de tumores malignos salivares de alto grado y de bajo grado se modifica en las áreas de invasión tisular?

OBJETIVOS

PRIMERO. Describir y cuantificar los linfocitos T CD3+, CD4+, CD8+, los linfocitos B CD20+, los macrófagos CD68+ y las células dendríticas S 100+ en los diferentes tipos histológicos de tumores malignos salivares, identificando la expresión en los nódulos tumorales principales y en las áreas periféricas de infiltración tumoral.

SEGUNDO. Determinar las diferencias cuantitativas de cada tipo de células inmunocompetentes, tanto en los nódulos tumorales, como en las áreas de infiltración, entre los grupos de alto y bajo grado de malignidad de los tumores salivares.

TERCERO. Valorar la correlación de los diferentes tipos de células inmunocompetentes en los tumores salivares de alto y bajo grado de malignidad, en relación con la capacidad infiltrativa del tumor.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

En este estudio, se ha evaluado la expresión inmunohistoquímica de marcadores de células inmunocompetentes (linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas) en Tumores Malignos de Glándulas Salivares (TMGS), utilizando tejidos histológicos previamente fijados en formol e incluidos en parafina, procedentes de los archivos del Departamento de Patología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de la Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, de Monterrey, México.

El principal criterio de selección del material del presente estudio fue que todos los casos con TMGS tuvieran interfase entre la masa tumoral y el tejido glandular o con el tejido desmoplásico peritumoral. Además, como criterio de inclusión, también se procuró que los casos seleccionados fueran aleatorios, y que al menos cada caso tuviera 10 preparaciones y bloques de tejido para la realización de una nueva confirmación del diagnóstico de cada tipo de TMGS. En total en la presente Tesis se evaluaron 49 casos con TMGS y 4 glándulas salivares normales (grupo control) que se distribuyeron en los siguientes grupos:

- Grupo I.** 4 Glándulas salivares normales (grupo control).
- Grupo II.** 7 pacientes diagnosticados de Carcinoma Adenoide Quístico.
- Grupo III.** 4 pacientes diagnosticados de Carcinoma de Células Acinares.
- Grupo IV.** 9 pacientes diagnosticados de Adenocarcinoma Ductal, dos de los cuales tenían un Adenocarcinoma tipo NOS.
- Grupo V.** 20 pacientes diagnosticados de Carcinoma Mucoepidermoide, de los cuales 11 casos eran Carcinoma Mucoepidermoide de Alto Grado y 9 casos eran Carcinoma Mucoepidermoide de Bajo Grado.
- Grupo VI.** 6 pacientes diagnosticados de Carcinoma Epitelial-Mioepitelial.
- Grupo VII.** 3 pacientes diagnosticados de Adenocarcinoma Polimorfo de Bajo Grado.

MÉTODOS

Métodos de Estudio Histológico General

Fijación de las Piezas

La mayoría de las piezas de tumorectomía se fijaron por inmersión en formol neutro taponado al 4%, durante 72 horas.

Métodos de Secciones con Microtomo y Tinciones Histológicas

Las piezas de tumorectomía fueron seccionadas, obteniéndose cortes de alrededor de 3 mm de espesor. A continuación, se procedió a la inclusión en parafina en el procesador de tejidos automatizado, lo que permitió realizar la deshidratación de las secciones fijadas mediante pases consecutivos en alcohol de concentraciones crecientes (70%, 96% y alcohol absoluto) y aclarado posterior en acetato de butilo, dando dos pases de una hora cada uno. Finalmente, las secciones tisulares se incluyeron en parafina líquida (punto de fusión 60º C) durante dos horas.

Una vez realizados los bloques de parafina, se obtuvieron 5 cortes seriados de 5 µm de espesor, y las secciones se desparafinaron en xilol, se hidrataron en alcoholes de concentraciones decrecientes y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE), PAS (ácido peryódico y reactivo de Schiff, con y sin digestión por la diastasa), tricrómico de Masson y técnica de fibras elásticas con coloración de van Giesen (EVG), siguiendo los métodos histológicos habituales. Las preparaciones recién teñidas se aclararon en agua destilada. Como método de montaje para todas las técnicas histológicas se utilizó la resina sintética DePex (Probus, Badalona).

Método Inmunohistoquímico de la Expresión Proteica

Para estudiar la expresión de todas las moléculas evaluadas en los TMGS, se ha utilizado, en primer lugar, el método inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP), con el fin de hacer en algunos casos seleccionados al azar una evaluación previa de las condiciones metodológicas específicas para cada anticuerpo usado; y ya en

segundo lugar, en todos los casos incluidos en nuestro Material de TMGS se realizó una detección de los diferentes epítopes de células inmunocompetentes estudiados.

En todos los casos, la recuperación antigénica se hizo en olla a presión, en buffer citrato pH 6. Como anticuerpo secundario y sistema de detección enzimática se utilizó el kit Universal Dako LSAB®+ Kit, Peroxidase (LSAB+ Kit, HRP).

En la Tabla 4 Se incluyen los anticuerpos utilizados, su clon -en el caso de que se trate de un anticuerpo monoclonal-, nombre de la casa comercial suministradora (incluido el código de cada anticuerpo), y dilución de trabajo en nuestro laboratorio.

Tabla 4. Relación de anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Clon	Casa	Dilución
CD3 (monoclonal mouse anti-human CD3)	F7.2.38	DAKO (M7254)	1:100
CD4 (monoclonal mouse anti-human CD4)	4B12	DAKO (M7310)	1:25
CD8 (monoclonal mouse anti-human CD8)	C8/144B	DAKO (M7103)	1:100
CD20 (monoclonal mouse anti-human CD20)	L26	DAKO (M0755)	1:100
CD68 (monoclonal mouse anti-human CD68)	KP1	DAKO (M0814)	1:100
S100 (monoclonal mouse anti-human S100)	Polyclonal	DAKO (Z0311)	1:100

Método Inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP)

Para realizar el método inmunohistoquímico de SBP en la detección de la expresión de estos 6 anticuerpos se obtuvieron cortes de 5 µm de grosor del material incluido en parafina y se colocaron en portaobjetos tratados previamente con L-polilisina (Sigma, St Louis) o con xilano (Sigma, St Louis) durante 24 horas, con el fin de adherir mejor el corte al portaobjetos.

Las secciones se procesaron con el método de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (Complejo SBP), siguiendo el método general inmunohistoquímico, descrito por Hsu *et al.*, 1981,⁶⁴ con las modificaciones habituales de nuestro laboratorio,^{21,29,75,77,98,112} que se especifican a continuación: se realizó la desparafinación completa de las secciones, seguido de la hidratación en alcoholes decrecientes hasta el agua destilada. A continuación se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena de los tejidos mediante peróxido de hidrógeno al 3% a temperatura ambiente durante diez minutos. Los cortes se lavaron en buffer fosfato (PBS) a temperatura ambiente, pH 7,4, durante 5 minutos. Se procedió al desenmascaramiento del epitopo mediante tratamiento por calor; para ello, las preparaciones se introdujeron en buffer citrato a pH 7,6 y se realizó el tratamiento con olla a presión, procurando que las preparaciones no llegasen a hervir, y enfriando las mismas entre cada uno de los pases. Posteriormente, las preparaciones se dejaron reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizó un lavado rápido, dos minutos, en H₂O destilada para retirar el sobrenadante del buffer citrato. Lavamos las preparaciones en dos pases de 5 minutos en buffer PBS, pH 7,4. Seguidamente, realizamos el bloqueo de las inmunoglobulinas inespecíficas de los tejidos con suero bovino normal durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se extrajo el sobrenadante del suero bovino, sin lavar nunca entre este paso y el siguiente. A continuación, añadimos el anticuerpo primario (ver tabla 4), en una solución de PBS+ BSA al 1%. El anticuerpo primario se incubó durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Las secciones se lavaron en tres pases de PBS, de 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente. Se aplicó a las secciones el kit Universal Dako LSAB[®]+ Kit, Peroxidase (LSAB+ Kit, HRP), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron posteriormente tres lavados en PBS durante 5 minutos. La inmunorreacción se reveló con diaminobencidina DAB (Dako, K3468) durante 3 minutos. A continuación, se hizo una tinción nuclear con hematoxilina de Harris. Las preparaciones se lavaron con abundante agua destilada, se deshidrataron en etanol en concentraciones crecientes, y se montaron en la resina sintética DePex.

Métodos de Cuantificación de la Intensidad de Inmunoexpresión

Para los estudios semicuantitativos, se ha seleccionado una preparación histológica representativa de cada caso, en la que se comprobó una correcta realización del método inmunohistoquímico para la detección de los diferentes anticuerpos evaluados.¹⁴⁸ Se realizaron cuantificaciones en dos zonas bien definidas: 1) dentro de la masa tumoral, y 2) en los bordes de invasión del tumor, esto es, en la interfase de la masa tumoral principal, bien con el tejido glandular adyacente, o bien con el tejido desmoplásico pseudocapsular que rodea a los nódulos tumorales.

El proceso de selección de campos microscópicos, con el fin de efectuar después las cuantificaciones histométricas, se describe a continuación brevemente: Las áreas seleccionadas para las cuantificaciones fueron aquellas que, habiendo sido valoradas por tres patólogos, se consideraron adecuadas por no presentar necrosis, abscesos y hemorragias en el tejido tumoral. La selección de campos dentro de las áreas se llevó a cabo aleatoriamente; el límite exterior de las áreas se dibujó sobre la laminilla y ésta se desplazó sin sobrepasar los límites marcados y sin realizar valoraciones subjetivas de visualización directa de los campos microscópicos elegidos.

Se escogieron 10 campos en cada área previamente delimitada, ya que usualmente este es el número que se selecciona para una visualización de distribución espacial homogénea. Se verificaron dos métodos de selección de campos microscópicos para una superficie dada. En el primero, denominado de "*selección subjetiva*", uno de los más usados hasta este momento, un observador selecciona diez campos asegurándose de que estén distribuidos homogéneamente sobre la superficie seleccionada. Este método, rápido y sencillo, pudiera fácilmente ser sesgado. Las posibilidades de sesgo generadas por el muestreo objetivo de este estudio fue comprobado utilizando un segundo método, denominado de "*selección aleatoria*", la cual es no sesgada. Para este propósito, se utilizó un retículo para dividir la superficie del campo en 100 partes iguales. A cada campo se le asignó una combinación de dos dígitos, y a través del uso de una tabla de números al azar se escogieron 10 combinaciones. Este método es más laborioso pero garantiza la ausencia de

sesgo. Los dos métodos se utilizaron para seleccionar los campos en cada sección. En cada campo microscópico, tomado con un objetivo de 40 aumentos, se contaron las células inmuomarcadas con cada anticuerpo, tanto del tumor como del borde de la lesión.

Métodos Estadísticos

Para informatizar los datos, se creó una base de datos (BD) con el programa Microsoft Access y se procesaron con la estructura adecuada para poder analizarlos posteriormente.

El análisis estadístico se realizó en el programa estadístico GraphPad Prism versión 6.0 (Graphpad, San Diego, USA). La diferencia de medias de los distintos tipos de marcadores, según el tipo de tumor, se estableció mediante la prueba T de Student con dos colas y con corrección para varianzas no homogéneas. Las asociaciones entre los diferentes marcadores, para cada tipo de tumor, se evaluaron mediante análisis de correlación paramétrica de Pearson. En todos los análisis, valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas.

Técnicas Fotográficas

Las imágenes microscópicas han sido capturadas con una cámara digital Leica DC200, almacenadas en formato TIFF y tratadas con el programa Adobe Photoshop CS4. La composición de las planchas iconográficas se ha realizado con el programa Quark X Press Passport 6.0.

RESULTADOS

En la presente serie de 49 tumores malignos de glándulas salivares, los datos clínicos, la localización del tumor, el diagnóstico histopatológico y la clasificación de extensión tumoral TNM están incluidos en la Tabla 5.

Tabla 5. Datos clínicos de los tumores malignos de glándulas salivares.

Nº	ES	Loc	T (cm)	DH	Mac Int	Mic Inf	T/N/M
21	86M	Submaxilar derecha	6,0 x 3,5	Carcinoma Adenoideo Quístico	No	Si	3/0/0
22	49V	Submaxilar derecha	3,0 x 3,0 x 2,5	Carcinoma Adenoideo Quístico	No	Si	2/0/0
23	69M	Labio superior	1,6 x 1,0 x 0,5	Carcinoma Adenoideo Quístico	No	Si	1/0/0
24	60M	Región mandibular	1,6 x 1,0 x 0,6	Carcinoma Adenoideo Quístico	No	Si	1/0/0
25	¿M	Conducto auditivo	2,2 x 1,7 x 0,3	Carcinoma Adenoideo Quístico	No	Si	2/0/0
26	40M	Región retroauricular	1,5 x 1,0 x 0,5	Carcinoma Adenoideo Quístico	No	Si	1/0/0
27	41M	Parótida	1,2 x 1,0 x 1,0	Carcinoma Adenoideo Quístico	No	Si	1/0/0
28	78V	Parótida derecha	5,5 x 5,0 x 3,0	Carcinoma de Células Acinares	Si	No	3/0/0
29	14M	Parótida derecha	2,5 x 2,4 x 1,5	Carcinoma de Células Acinares	Si	No	2/0/0

Tabla 5. Continuación 1.

N°	ES	Loc	T (cm)	DH	Mac Int	Mic Inf	T/N/M
30	23V	Parótida izquierda	2,9 x 2,1	Carcinoma de Células Acinares	Si	No	2/0/0
31	61V	Parótida derecha	2,6 x 2,3 x 1,0	Carcinoma de Células Acinares	Si	No	2/0/0
38	74V	Parótida derecha	2,5 x 1,3	Adenocarcinoma ductal tipo oncocítico	Si	Si	2/0/0
39	40M	Parótida izquierda	Blocks rev	Adenocarcinoma ductal poco diferenciado con áreas oncocíticas	No	Si	X/X/X
40	43V	Parótida izquierda	8,0 x 6,5 x 7,0	Adenocarcinoma ductal indiferenciado de células grandes	No	Si	3/2a/0
41	76V	úvula	3,0 x 2,5	Adenocarcinoma salival de tipo ductal	No	Si	2/0/0
42	72V	Parótida izquierda	2,0 x 1,5	Adenocarcinoma ductal poco diferenciado	No	Si	1/1/0
45	69V	Parótida derecha	1,5 x 1,0	Adenocarcinoma ductal	No	Si	1/1/0
43	95V	Parótida izquierda	3,5 x 3,5	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	No	Si	2/0/0
44	16M	Submaxilar izquierda	6,0 x 4,5 x 2,0	Adenocarcinoma NOS	No	Si	3/0/0

Tabla 5. Continuación 2.

N°	ES	Loc	T (cm)	DH	Mac Int	Mic Inf	T/N/M
46	74M	Parótida derecha	3,0 x 2,7	Adenocarcinoma NOS	No	Si	2/0/0
1	49V	Parótida izquierda	7,5 x 5,5 x 2,5	Carcinoma Mucoepidermoide de alto grado	No	Si	3/0/0
2	67M	Parótida izquierda	3,0 x 2,5 x 2,0	Carcinoma Mucoepidermoide de alto grado	No	Si	2/0/0
3	81V	Submax y Piso boca	4,0 x 2,0 x 1,5	Carcinoma Mucoepidermoide de alto grado	No	Si	2/1/0
4	80V	Piso boca	1,6 x 0,6	Carcinoma Mucoepidermoide de alto grado	No	Si	1/0/0
6	48V	Parótida	2,2 x 1,9 x 1,0	Carcinoma Mucoepidermoide de alto grado	No	Si	2/1/0
9	68V	Parótida izquierda	5,5 x 5,0 x 4,5	Carcinoma Mucoepidermoide de alto grado	No	Si	3/1/0
10	55V	Paladar izquierdo	3,5 x 2,5	Carcinoma Mucoepidermoide de alto grado	No	Si	2/0/0
11	49M	Parótida	2,0 x 1,3 x 0,9	Carcinoma Mucoepidermoide de alto grado	No	Si	1/0/0
12	49M	Parótida derecha	5,0 x 5,0 x 3,8	Carcinoma Mucoepidermoide de alto grado	No	Si	4a/1/0

Tabla 5. Continuación 3.

N°	ES	Loc	T (cm)	DH	Mac Int	Mic Inf	T/N/M
14	74V	Mucosa subgingival	0,8 x 0,6 x 0,4	Carcinoma Mucoepidermoide de alto grado	No	Si	1/0/0
18	79V	Submaxilar izquierda	No especifico	Carcinoma Espinocelular (alto grado)	No	Si	3/1/0
5	15V	Parótida	2,2 x 2,0 x 2,0	Carcinoma Mucoepidermoide de bajo grado	No	Si	2/0/0
7	11V	Submaxilar izquierda	blocks rev	Carcinoma Mucoepidermoide de bajo grado	No	Si	1/0/0
8	21V	Parótida derecha	2,3 x 1,5	Carcinoma Mucoepidermoide de bajo grado	Si	Si	2/0/0
15	39M	Parótida	blocks rev	Carcinoma Mucoepidermoide de bajo grado	No	Si	X/X/X
16	17M	Parótida izquierda	blocks rev	Carcinoma Mucoepidermoide de bajo grado	Si	Si	X/X/X
17	17M	Parótida derecha	1,3 x 1,0 x 1,0	Carcinoma Mucoepidermoide de bajo grado	No	Si	1/0/0
19	29M	Parótida	7,5 x 4,0 x 1,4	Carcinoma Mucoepidermoide de bajo grado	No	Si	3/1/0
20	63M	Lengua	1,5 x 1,0 x 1,0	Carcinoma Mucoepidermoide de bajo grado	No	Si	1/0/0

Tabla 5. Continuación 4.

N°	ES	Loc	T (cm)	DH	Mac Int	Mic Inf	T/N/M
13	15M	Base de lengua	2,7 x 2,3 x 1,0	Carcinoma Mucoepidermoide de bajo grado	No	Si	2/0/0
36	56M	Submaxilar izquierda	blocks rev	Carcinoma Mioepitelial de alto grado	No	Si	X/1/0
35	52M	Parótida izquierda	blocks rev	Carcinoma Mioepitelial	X	Si	X/X/X
37	74M	Parótida derecha	2,1 x 2,0 x 2,0	Carcinoma Epitelial-Mioepitelial	Si	Si	2/0/0
32	72M	Parótida izquierda	4,3 x 3,5 x 2,6	Carcinoma Epitelial-Mioepitelial	Si	Si	3/0/0
33	37V	Parótida derecha	4,5 x 3,0 x 2,0	Carcinoma Mioepitelial	Si	Si	3/0/0
34	57M	Parótida izquierda	4,6 x 3,5 x 1,5	Carcinoma Epitelial-Mioepitelial	Si	Si	3/0/0
47	58M	Paladar duro	3,0 x 2,0 x 1,0	Adenocarcinoma polimorfo de bajo grado	No	Si	2/0/0
48	46M	Maxilar sup derecho	5,7 x 5,0 x 4,2	Adenocarcinoma polimorfo de bajo grado	No	Si	3/0/0
49	41M	Parótida derecha	1,7 x 1,5	Adenocarcinoma polimorfo de bajo grado	No	Si	1/0/0

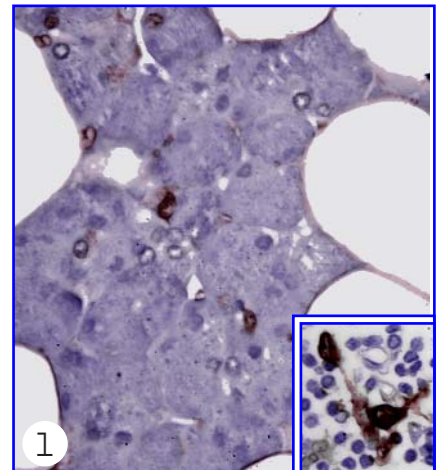
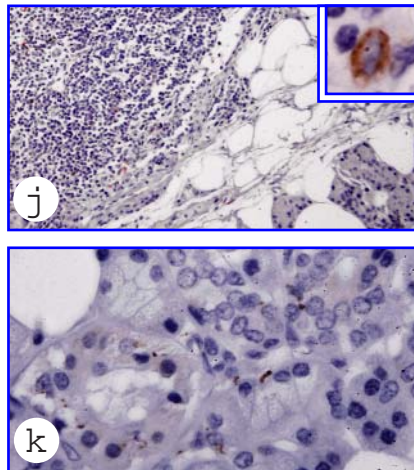
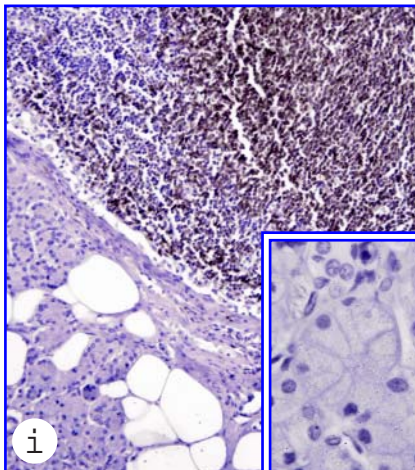
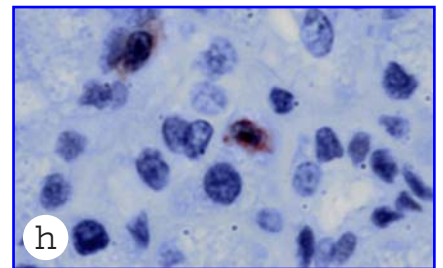
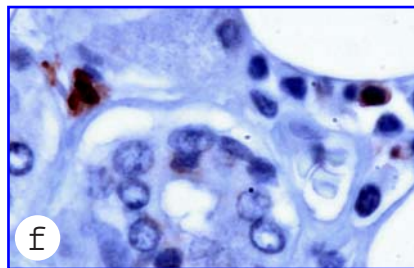
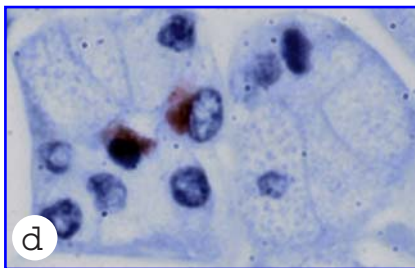
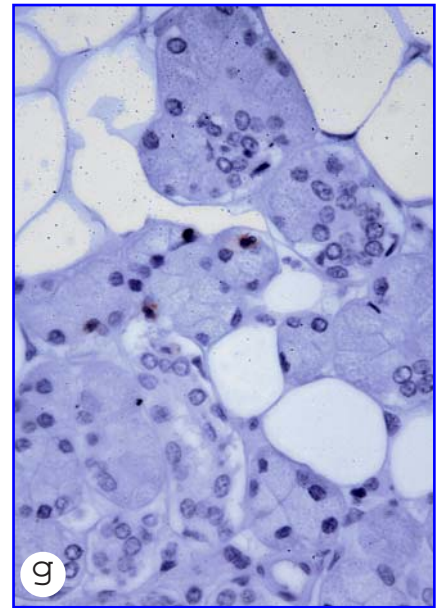
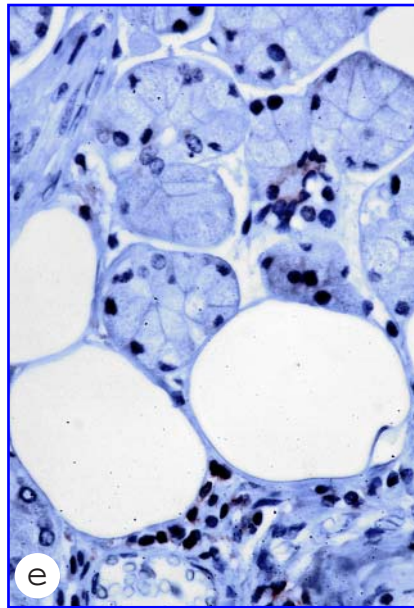
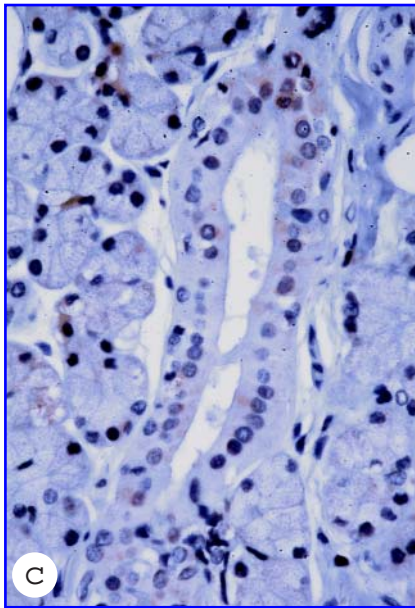
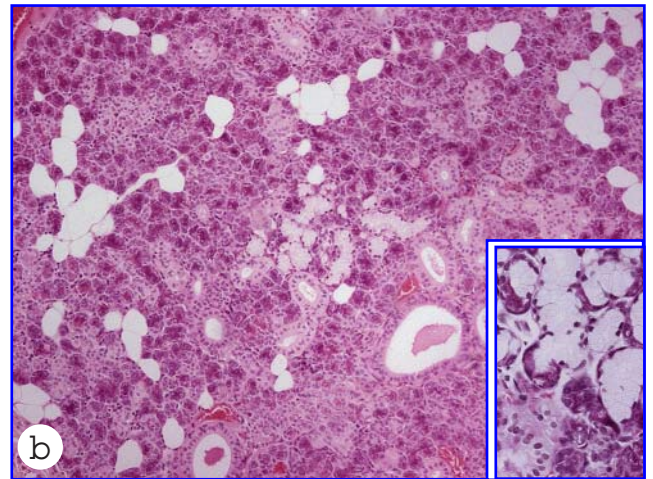
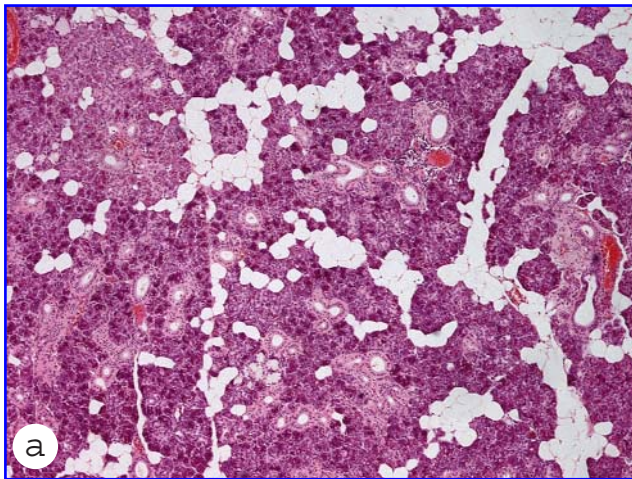
ES: Edad (años)/Sexo (M= mujer y V=varón); Loc: Localización; T: Tamaño; DH: Diagnóstico histopatológico; Mac Int: Macroscópicamente intraglandular (macroscópicamente el tumor es de localización dentro de la glándula); Mic Inf: Microscópicamente infiltrante; T/N/M: estadio clínico del tumor.

Fig. 1. Células inmunocompetentes en glándulas salivares normales

- a) Glándula submaxilar Hematoxilina - Eosina.
- b) Lobulillos con acinis y conductos intercalares y estriados. Inset: células acinares serosas y mucosas. Hematoxilina - Eosina.
- c) Linfocitos CD3+ en relación con un acini seroso y migrando en el epitelio de un conducto interlobulillar. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- d) Linfocitos CD3+ en el interior de un acini mucoso. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- e) Se observa pequeño nido de linfocitos intralobulillares, algunos inmunomarcados con CD4. Anti- CD4 - Hematoxilina.
- f) Detalle de la figura anterior en donde se observan también linfocitos inmuno negativos. Anti- CD4 - Hematoxilina.
- g) Escasas células CD8+ en la vecindad de acini serosos. Anti- CD8 - Hematoxilina.
- h) Los linfocitos T tienen un refuerzo de inmunomarcaje en la membrana. Anti- CD8 - Hematoxilina.
- i) Ganglio linfático en la vecindad de una glándula submaxilar. En el ganglio se observan abundantes linfocitos B CD20+. Contrariamente, los linfocitos CD20+ son muy escasos en la glándula salivar. Inset: acini serosos sin células inmunocompetentes. Anti- CD20 - Hematoxilina.
- j) Ganglio linfático con sinusoides dilatados que contienen algunos macrófagos CD68+ (inset). Anti- CD68 - Hematoxilina.
- k) Los macrófagos CD68+ son muy escasos en el tejido de glándulas salivares. Anti- CD68 - Hematoxilina.
- l) Glándula submaxilar con varias células dendríticas S100+. Inset: célula dendrítica localizada en un ganglio linfático con numerosas ramificaciones S100+. Anti- S100 - Hematoxilina.

Glándula Salivar Normal

Células inmunocompetentes intraglandulares



Carcinoma Adenoideo Quístico

Se han cuantificado las células inmunocompetentes en siete casos diagnosticados de carcinoma adenoide quístico, diferenciando el inmunofenotipo de los nódulos tumorales con respecto a las áreas infiltrativas de la periferia del tumor. La cuantificación de estas células inmunocompetentes en el centro de la masa tumoral obtiene un bajo número de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+, y también escasos infiltrados de linfocitos B CD20+; además, no se han encontrado diferencias significativas entre estos marcadores (Tabla 6 y Fig.2). Sin embargo, entre las células tumorales se identifica un apreciable número de macrófagos CD68+, siendo significativamente superior a los infiltrados de linfocitos. Entre las células tumorales se visualizan células dendríticas que expresan intensamente la proteína S100 dentro del citoplasma perinuclear y también sus prolongaciones.

El perfil inmunohistoquímico de células inmunocompetentes cambia notoriamente en las zonas periféricas del tumor, esto es, en los frentes de invasión tumoral, tanto en aquellas áreas delimitadas por una pseudocápsula fibrosa, como en las zonas de reacción desmoplásica en la vecindad del tejido glandular salivar conservado.

La cuantificación de células inmunocompetentes en la zona invasiva del tumor, en general, es entre cinco y diez veces superior para cada uno de los epítomos, con respecto a los nódulos tumorales. En la zona de invasión, el número de linfocitos T CD4+ y CD8+ es significativamente superior al de linfocitos B Cd20+, aunque no existen diferencias entre los dos tipos de linfocitos T. Las diferencias numéricas encontradas entre estos linfocitos T CD4+ y CD8+ y el marcador de panT CD3+ no es valorable.

Tabla 6. Carcinoma adenoideo quístico (media \pm SEM, n=7).

Marcador	Intratumoral	Invasivo
CD3	7.29 \pm 1.17 ^a	20.14 \pm 7.15 ^a
CD4	8.86 \pm 6.08 ^a	116.40 \pm 48.60 ^b
CD8	10.43 \pm 8.30 ^a	142.40 \pm 56.35 ^b
CD20	6.43 \pm 2.48 ^a	27.71 \pm 11.22 ^a
CD68	47.57 \pm 8.84 ^c	63.71 \pm 9.53 ^c
S100	21.43 \pm 7.40 ^a	25.29 \pm 4.53 ^a

Letras distintas, tanto entre filas como entre columnas, indican que existen diferencias significativas del número de células inmunocompetentes positivas ($p < 0.05$).

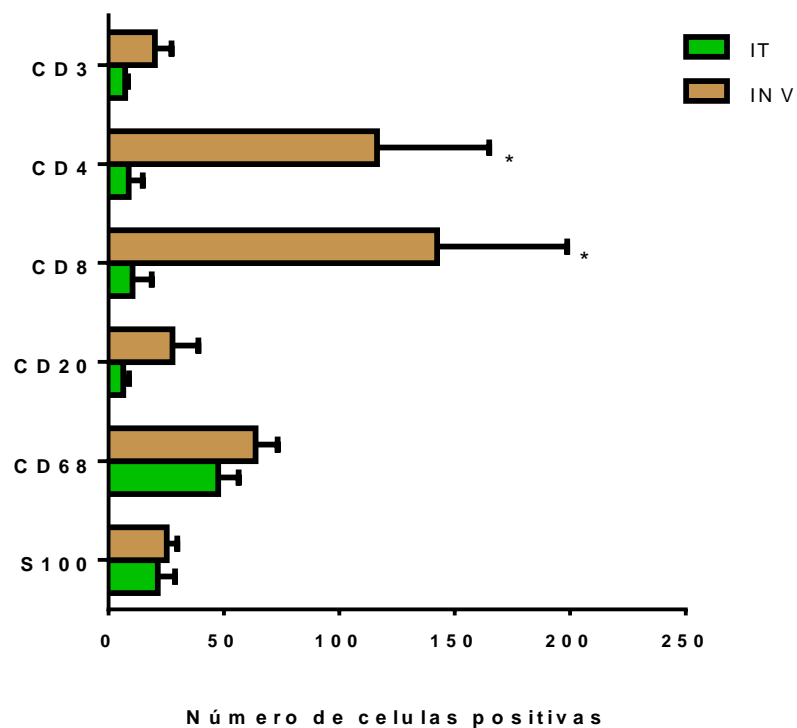
**Figura 2.** Carcinoma adenoideo quístico. IT: intratumoral; INV: invasivo.

Fig. 3. Carcinomas adenoide quísticos: Células inmunocompetentes intratumorales

- a) Patrón clásico del tumor adenoide quístico caracterizado por cordones de células tumorales con algunas dilataciones glandulares rodeados por un tejido conjuntivo desmoplásico. Hematoxilina - Eosina.
- b) Cordón con múltiples glándulas y formación de quistes delimitado por una membrana basal. Los linfocitos CD3+ son muy escasos en los tumores bien diferenciados. En la vecindad de un acini normal se observa un linfocito T inmunomarcado. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- c) Patrón difuso pobremente diferenciado con abundantes infiltrados inflamatorios, siendo evidente la presencia de linfocitos T CD4+. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- d) Patrón cordonal con abundantes linfocitos CD8+ en el intersticio y migrando entre las células tumorales malignas. Anti- CD8 - Hematoxilina.
- e) Linfocito CD8 en la vecindad de una célula tumoral con apoptosis. Anti- CD8 – Hematoxilina.
- f) Los linfocitos B CD20+ son muy escasos en el epitelio tumoral, siendo mucho más abundantes en la fibrosis intersticial adyacente. Anti- CD20 - Hematoxilina.
- g) Carcinoma moderadamente diferenciado con patrón glandular y cordonal sólido. Los macrófagos CD68+ son muy abundantes en este tumor. Inset: macrófago con abundantes lisosomas inmunomarcados. Anti- CD68 - Hematoxilina.
- h) Todos los nidos tumorales con el clásico patrón glandular cribiforme contienen abundantes células dendríticas S100+. Anti- S100 - Hematoxilina.
- i) Las células S100+ se distribuyen irregularmente tanto en el patrón glandular como en el sólido de este tumor. Anti- S100 - Hematoxilina.

Carcinoma Adenoide Quístico

Células inmunocompetentes intratumorales

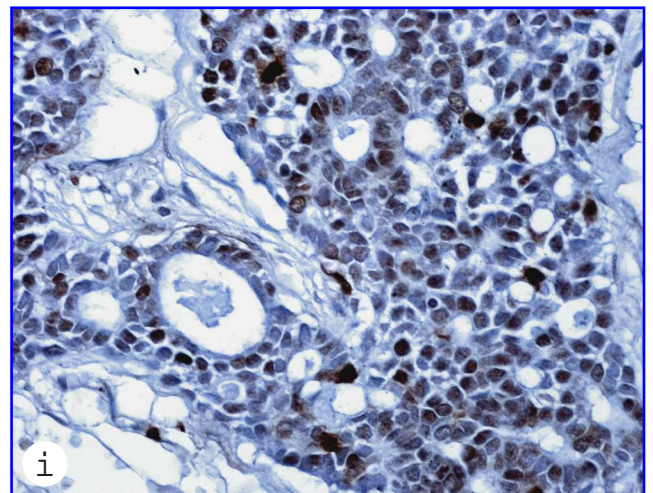
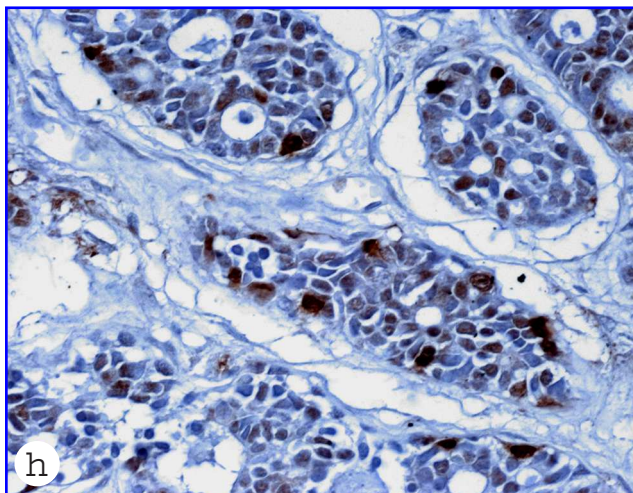
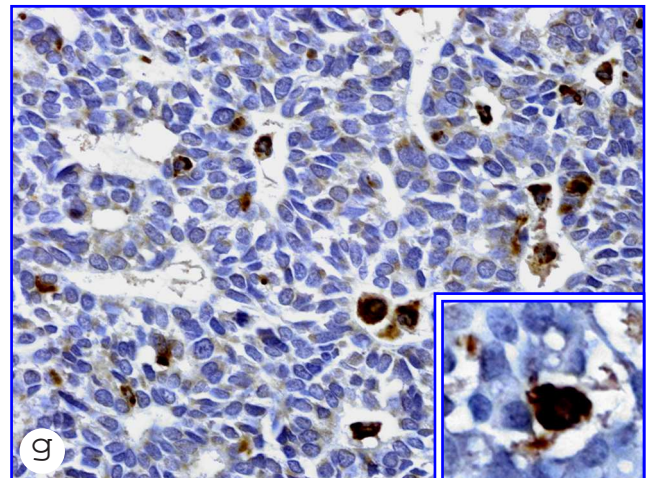
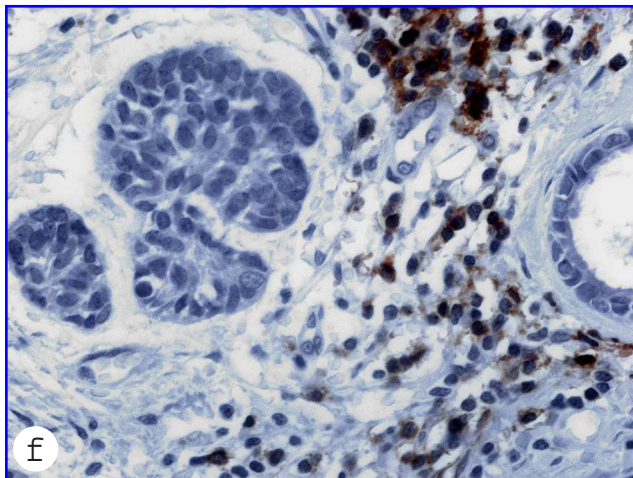
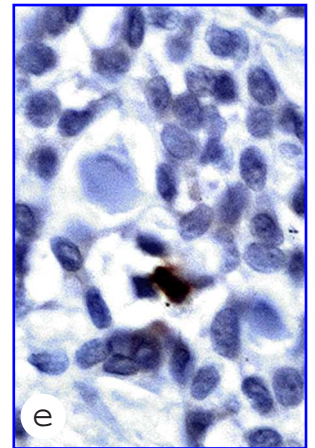
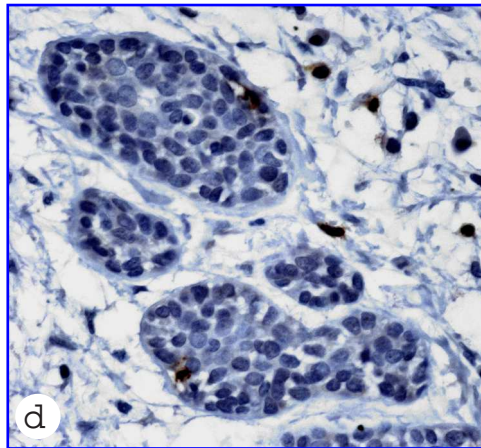
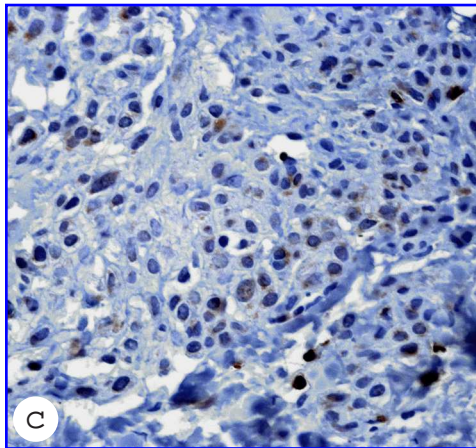
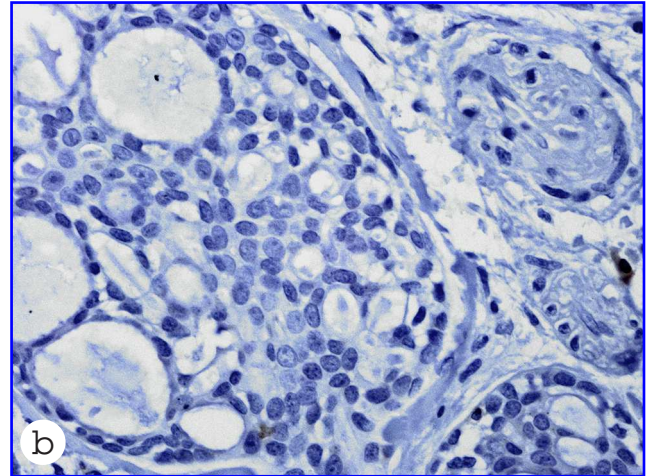
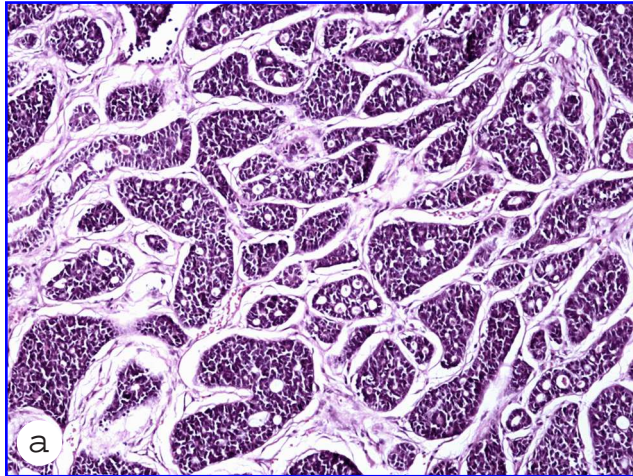
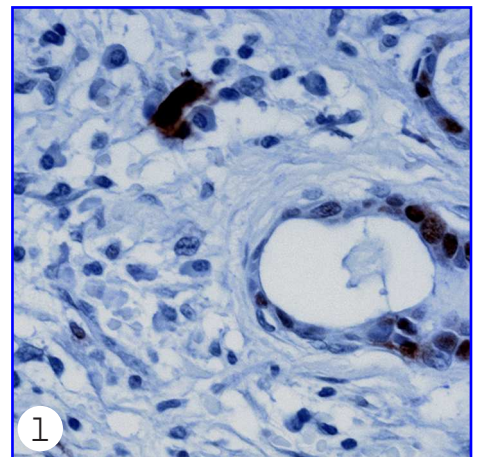
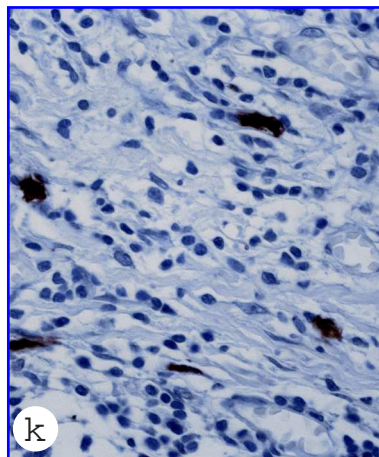
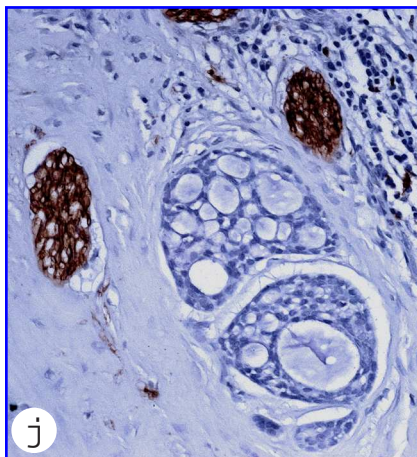
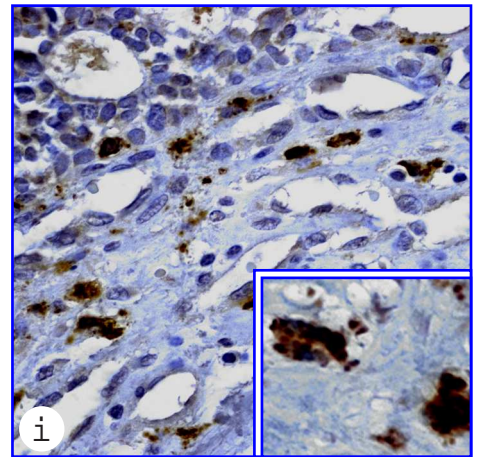
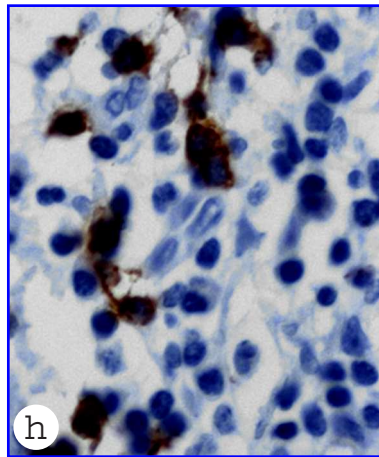
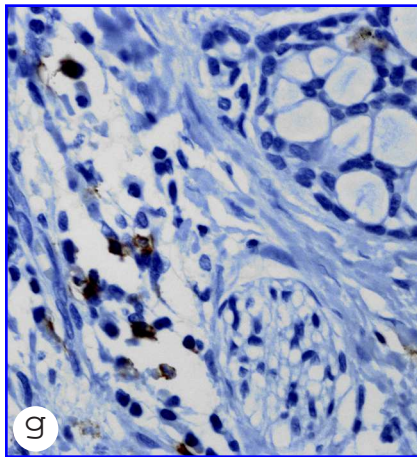
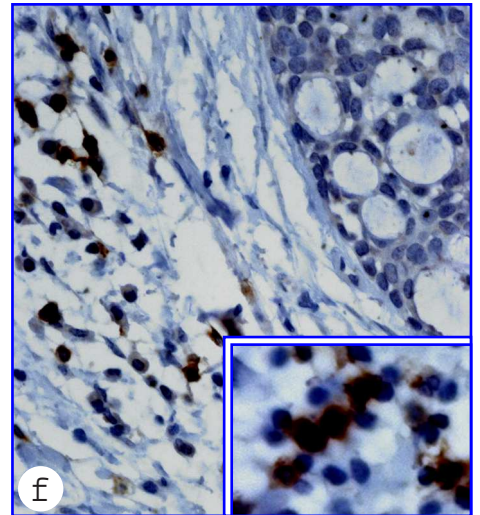
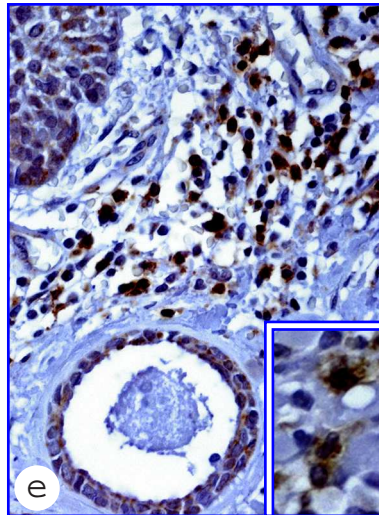
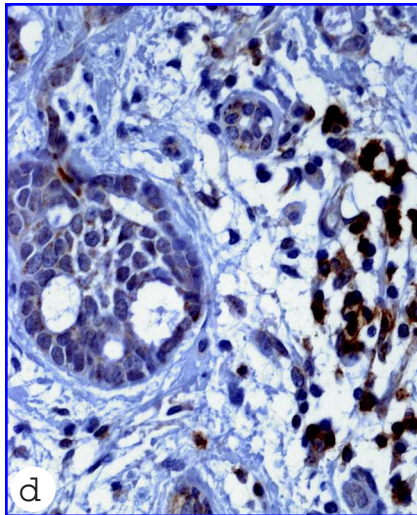
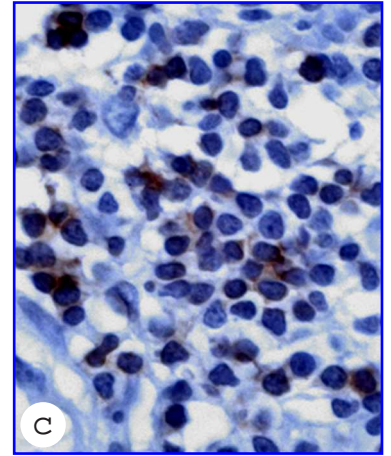
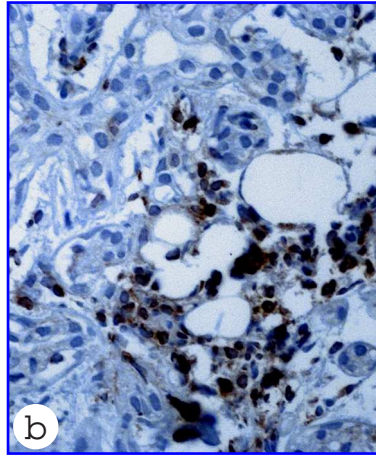
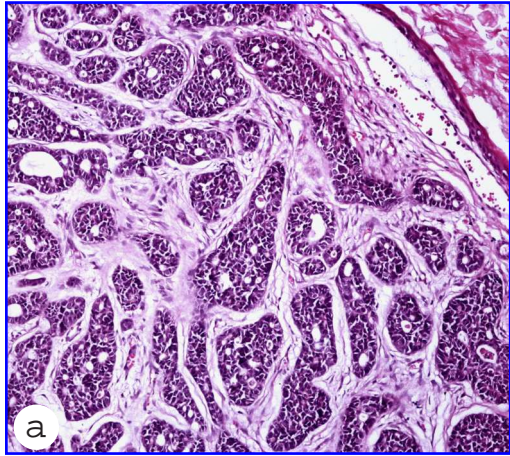


Fig. 4. Carcinomas adenoide quísticos: Células inmunocompetentes en zona de invasión

- a) Tumor bien diferenciado delimitado por una cápsula de tejido conjuntivo. Entre los cordones tumorales se observa fibrosis e infiltrados inflamatorios. Hematoxilina - Eosina.
- b) Abundantes linfocitos CD3+ en el tejido desmoplásico peritumoral. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- c) En la zona de invasión tumoral los infiltrados de células inmunocompetentes son muy abundantes y algunas células presentan evidente expresión de CD3. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- d) El tejido conjuntivo laxo que rodea los nidos tumorales contiene numerosos linfocitos T. Anti- CD4 - Hematoxilina.
- e) Interfase del tumor con la glándula salivar normal. Inset: la pseudocápsula formada presenta abundantes linfocitos T CD4+. Inset: patrón de membrana de la expresión del epítipo. Anti- CD4 - Hematoxilina.
- f) Zona periférica del tumor con pseudocápsula fibrosa en donde existen numerosos linfocitos T CD8+. Inset: intenso inmunomarcaje de los linfocitos T. Anti- CD8 - Hematoxilina.
- g) En la periferia del tumor los linfocitos B CD20+ son escasos. Anti- CD20 - Hematoxilina.
- h) Excepcionalmente en algunos casos con intensos infiltrados inflamatorios en la zona de infiltración tumoral se puede ver un mayor número de linfocitos B. Anti- CD20 - Hematoxilina.
- i) En las áreas de infiltración es frecuente identificar macrófagos. Inset: robusto marcaje de lisosomas en los macrófagos peritumorales. Anti- CD68 - Hematoxilina.
- j) En la periferia del tumor se pueden identificar varios fascículos nerviosos con células de Schwann inmunomarcadas. Anti- S100 - Hematoxilina.
- k-l) Dos áreas de infiltración tumoral con abundantes infiltrados inflamatorios y varias células dendríticas S100+. Anti- S100 - Hematoxilina.

Carcinoma Adenoide Quístico

Células inmunocompetentes en zona de invasión



Carcinoma de Células Acinares

Los carcinomas de células acinares son relativamente infrecuentes con respecto a otros tipos de tumores malignos de glándulas salivares y, por ello, en nuestra serie solo hemos encontrado cuatro pacientes con este tipo de tumor. La cuantificación de células inmunocompetentes en las áreas intratumorales demuestra cifras muy bajas de todos los epítomos que hemos identificado en el presente estudio; y aunque el número de linfocitos T CD8+ es ostensiblemente mayor que el número de linfocitos T CD4+, no se han encontrado diferencias significativas debido al bajo número de carcinomas de células acinares que se han podido estudiar (Tabla 7 y Fig. 5).

En las zonas de invasión tumoral, el número de cada tipo de células inmunocompetentes es el doble, o el triple, del encontrado en los nódulos tumorales. Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas en ambas zonas del tumor de la expresión de los diferentes marcadores de los linfocitos T. Sin embargo, en el frente de invasión tumoral existe un significativo mayor número de linfocitos B CD20+ que el observado en la masa tumoral principal. El mismo comportamiento ocurre cuando se cuantifican los macrófagos CD68*, cuyo número es significativamente superior en las zonas infiltrativas del tumor.

Las células dendríticas presentadoras de antígenos S100+, asimismo son más abundantes en las zonas desmoplásicas de invasión que en los nódulos tumorales, pero, de nuevo, no se han encontrado diferencias significativas entre ambas zonas del tumor.

Tabla 7. Carcinoma de células acinares (media \pm SEM, n=4).

Marcador	Intratumoral	Invasivo
CD3	16.00 \pm 6.18 ^a	89.50 \pm 30.38 ^a
CD4	9.00 \pm 5.07 ^a	82.50 \pm 35.33 ^a
CD8	36.50 \pm 28.18 ^a	110.00 \pm 31.80 ^a
CD20	16.25 \pm 4.90 ^a	93.75 \pm 21.86 ^{a*}
CD68	26.50 \pm 5.36 ^a	69.50 \pm 12.60 ^{a*}
S100	12.00 \pm 2.86 ^a	30.50 \pm 15.29 ^a

Letras distintas, tanto entre filas como entre columnas, indican que existen diferencias significativas del número de células inmunocompetentes positivas ($p < 0.05$). El asterisco indica diferencias significativas de las zonas invasivas con respecto a las intratumorales.

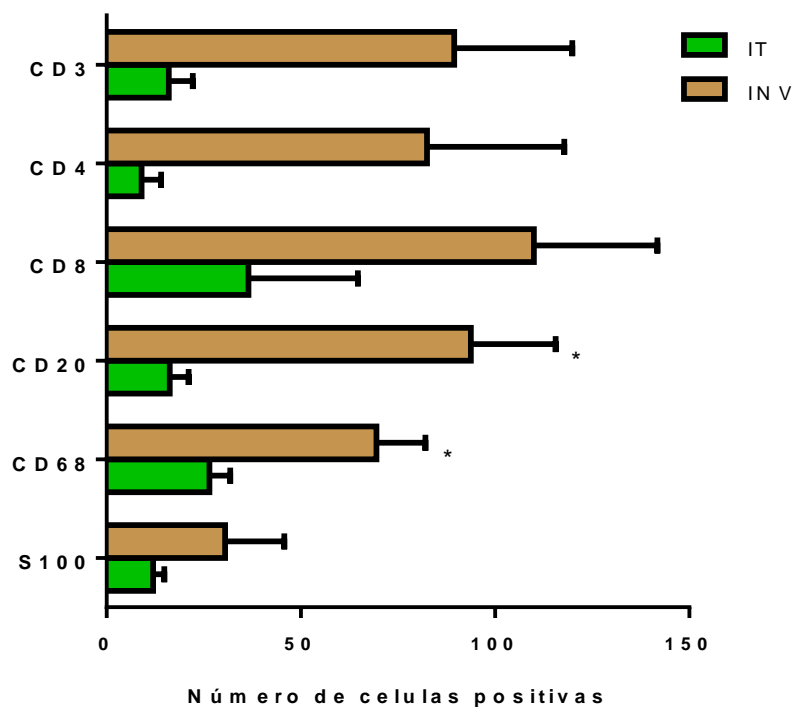
**Figura 5.** Carcinoma células acinares. IT: intratumoral; INV: invasivo.

Fig. 6. Carcinomas de células acinares: Células inmunocompetentes intratumorales

- a) Patrón bien diferenciado constituido por acinis tumorales. Hematoxilina - Eosina.
- b) Acinis tumorales con predominio de células mucosecretoras. Hematoxilina - Eosina.
- c-d) Acinis tumorales de diferente tamaño con abundante secreción serosa. Hematoxilina - Eosina.
- e-f) Predominio de linfocitos T infiltrantes en el tumor. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- g) Patrón acinar moderadamente diferenciado con nidos de linfocitos T CD4+. Anti- CD4 - Hematoxilina.
- h) Células tumorales mucosecretoras entremezcladas con linfocitos T. Anti- CD4 - Hematoxilina.
- i) Patrón sólido con abundantes células inmunocompetentes entre las cuales destacan los linfocitos T CD8+. Anti- CD8 - Hematoxilina.
- j) Fuerte marcaje con predominio de patrón de membrana de linfocitos CD8+ intratumorales. Anti- CD8 - Hematoxilina.
- k) La proliferación tumoral también desencadena una respuesta de linfocitos B CD20+. Inset: células B positivas asociadas a linfocitos negativos. Anti- CD20 - Hematoxilina.
- l-m) La infiltración de macrófagos entre las células tumorales es relevante. Anti- CD68 - Hematoxilina.
- n) Carcinoma indiferenciado en el que se identifican numerosas células dendríticas. Anti- S100 - Hematoxilina.

Carcinoma de Células Acinares

Células inmunocompetentes intratumorales

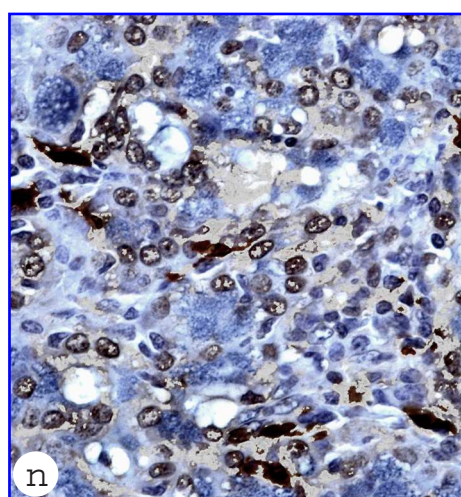
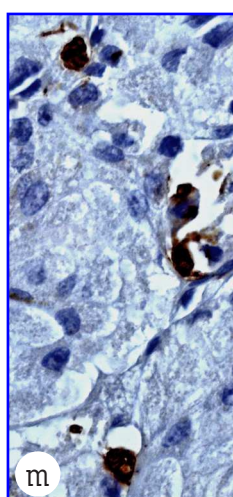
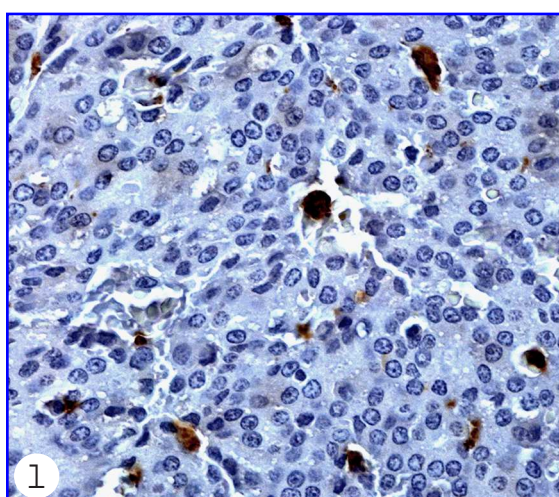
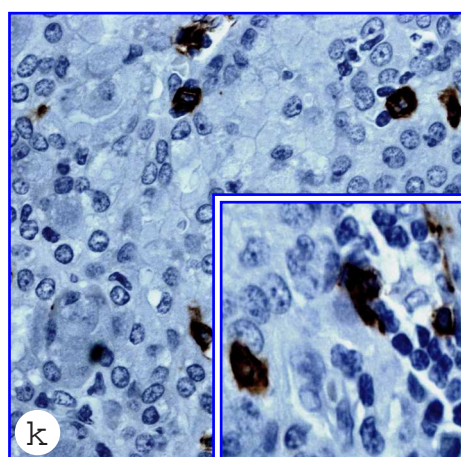
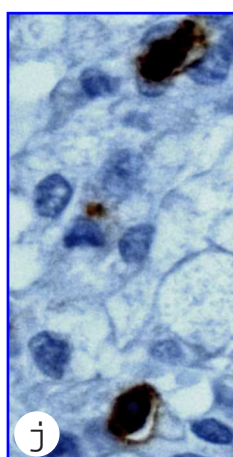
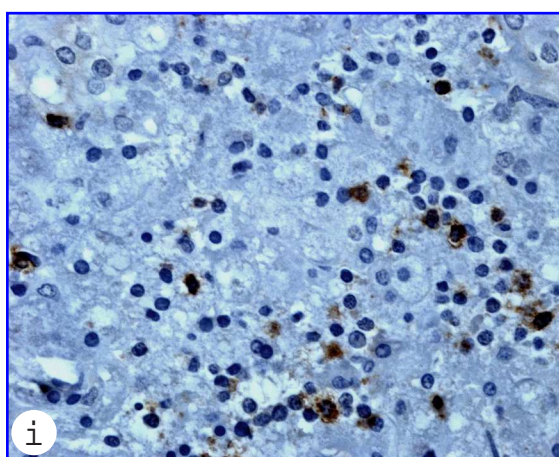
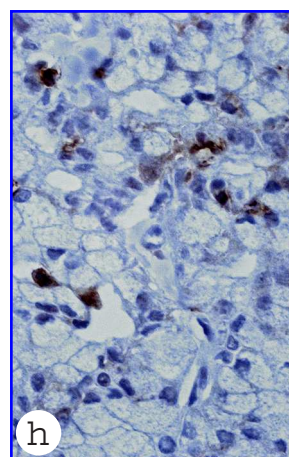
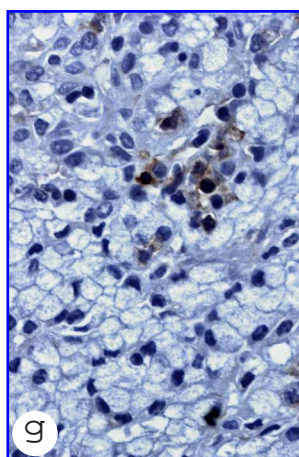
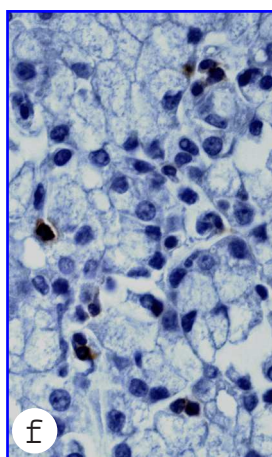
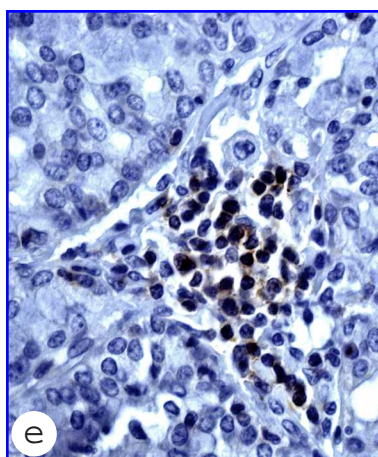
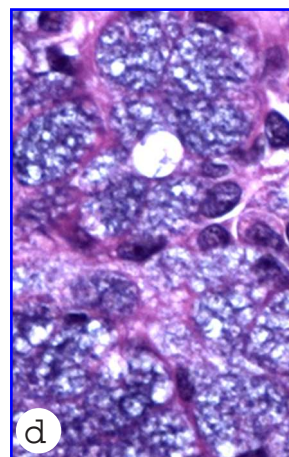
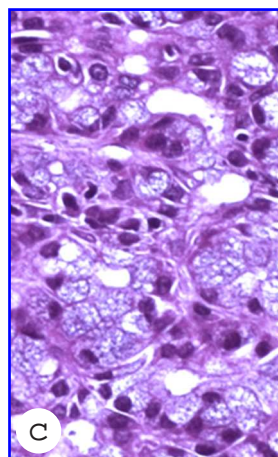
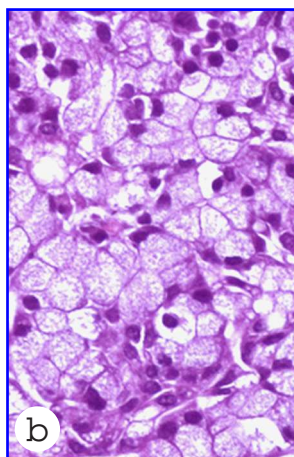
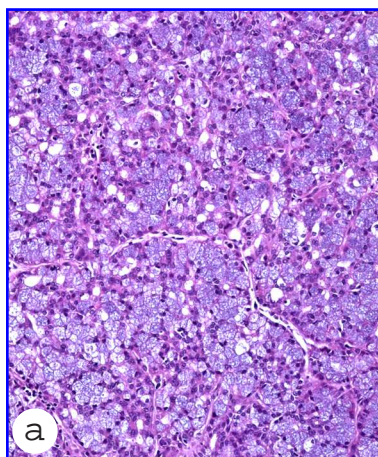
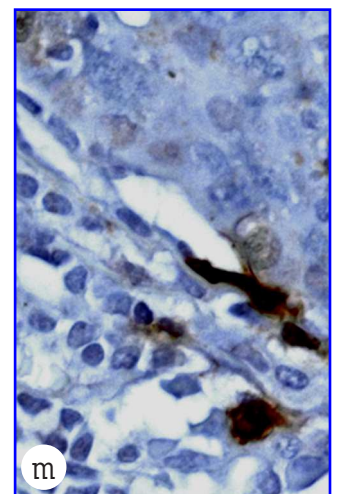
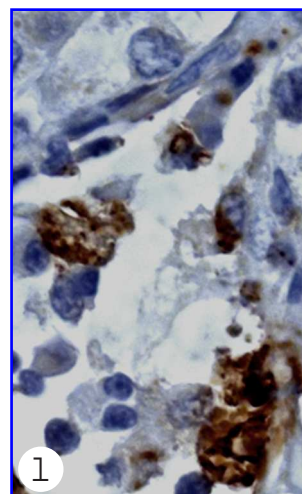
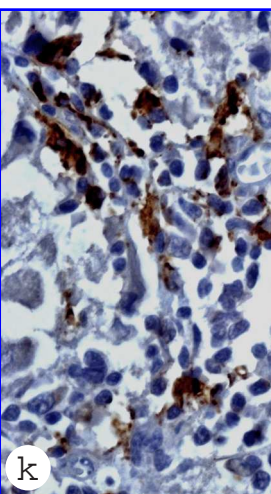
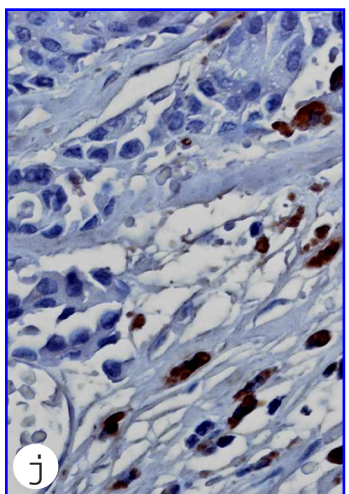
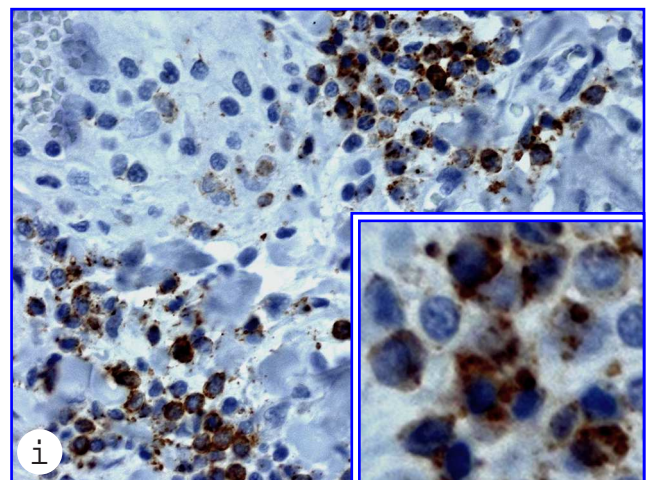
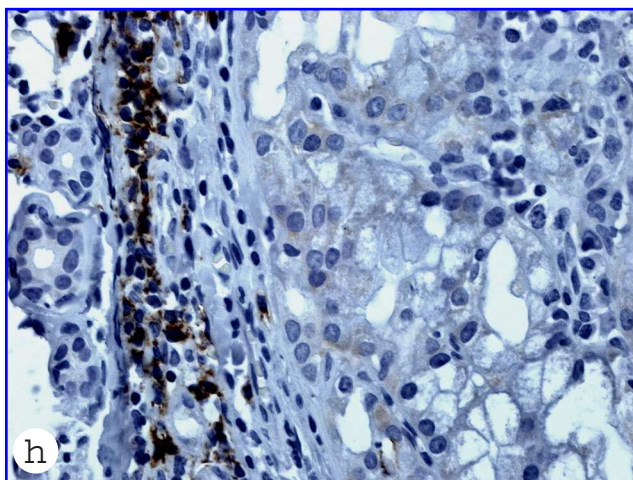
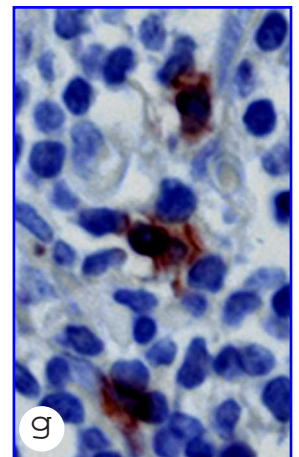
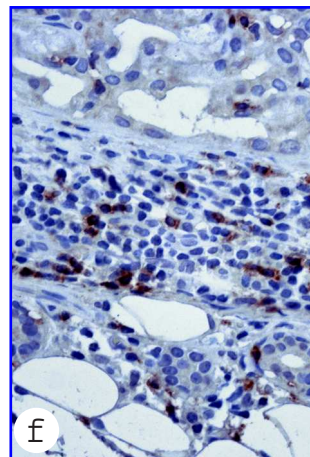
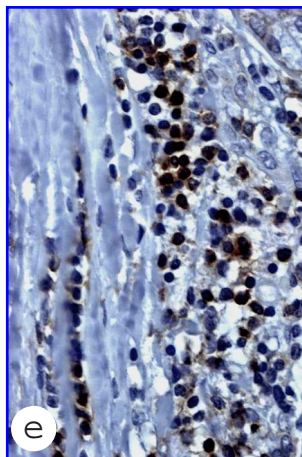
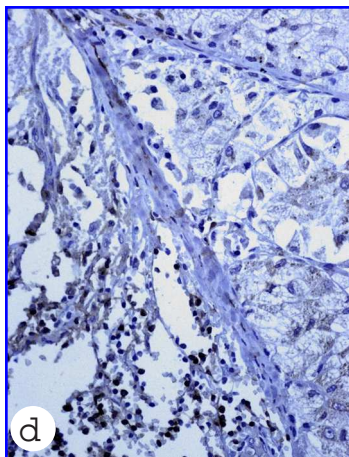
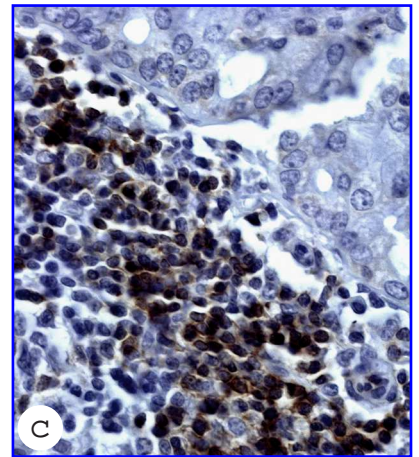
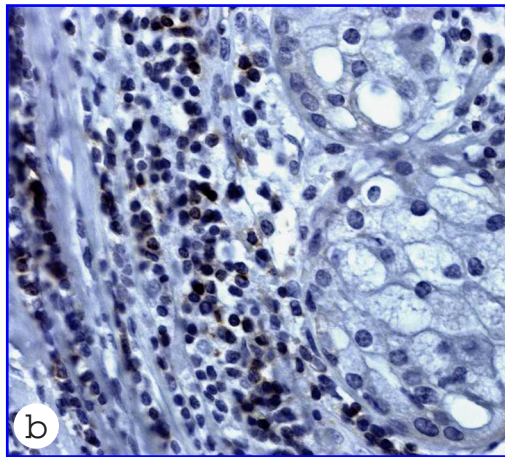
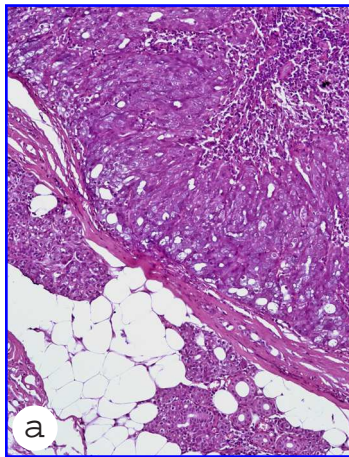


Fig. 7. Carcinomas de células acinares: Células inmunocompetentes en zona de invasión

- a)** Zona periférica del carcinoma acinar. Se observa una pseudocápsula que lo separa del tejido salivar normal. Hematoxilina - Eosina.
- b-c)** Los linfocitos T CD3+ son extraordinariamente abundantes en las zonas de infiltración tumoral. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- d-e)** En las áreas de infiltración tumoral se observan abundantes linfocitos TCD4+. Anti- CD4 - Hematoxilina.
- f-g)** Los infiltrados inflamatorios peritumorales son muy abundantes; sin embargo los linfocitos T CD8+ son más escasos. Anti- CD8 - Hematoxilina.
- h-i)** En el área pseudocapsular y en la periferia del tumor infiltrante también se observan abundantes linfocitos B CD20+. Inset: intensa inmunotinción de membrana en linfocitos B. Anti- CD20 - Hematoxilina.
- j-k)** La infiltración de macrófagos en las áreas infiltrantes tumorales es muy variable y frecuentemente se asocian a abundantes linfocitos. Anti- CD68 - Hematoxilina.
- l)** Los macrófagos CD68+ en las áreas de necrosis tumoral son microvacuolados. Anti- CD68 - Hematoxilina.
- m)** En las zonas de infiltración tumoral es frecuente observar células dendríticas. Anti- S100 - Hematoxilina.

Carcinoma de Células Acinares

Células inmunocompetentes en zona de invasión



Adenocarcinoma Ductal

En la presente serie de tumores malignos de glándulas salivares, nueve pacientes fueron diagnosticados de adenocarcinoma ductal, lo cual determina que el estudio cuantitativo de los diferentes marcadores de células inmunocompetentes aporte datos que permiten realizar una adecuada valoración estadística de los resultados. Los infiltrados de linfocitos asociados directamente a las células tumorales proliferantes (TIL: *tisular infiltrated lymphocytes*) son muy escasos y, además, no se han encontrado diferencias significativas entre el número de linfocitos T y B. Sin embargo, el número de macrófagos dispuesto entre las células tumorales es significativamente mayor que el de las células inmunocompetentes en los nódulos tumorales principales. De otra parte, el número de células dendríticas S100+ es bajo en todos los campos explorados del centro del tumor, y significativamente inferior con respecto al número de macrófagos (Tabla 8 y Fig 8).

Contrariamente, en los bordes de invasión tumoral el número de células inmunocompetentes es mucho más alto, lo que se demuestra en todos y cada uno de los epítomos explorados. En este sentido, el número total de linfocitos T CD4+ y CD8+ es significativamente mayor en la zona de invasión con respecto a las áreas intratumorales. Así mismo, también en las zonas infiltrativas existe un significativo mayor número de linfocitos B y de macrófagos, siendo relevante también la importante presencia de células dendríticas presentadoras de antígenos S100+ en las zonas desmoplásicas periféricas y de invasión tumoral. No obstante, en las zonas de invasión tumoral, el análisis estadístico cuando se compara el número de células inmunomarcadas con los diferentes anticuerpos usados en este estudio no obtiene diferencias significativas de la predominancia de una estirpe de linfocitos, ni tampoco entre los macrófagos y las células dendríticas (Tabla 8 y Fig 8).

Tabla 8. Adenocarcinoma ductal (Media \pm SEM, n=9).

Marcador	Intratumoral	Invasivo
CD3	12.56 \pm 1.14 ^a	34.67 \pm 12.64 ^{a*}
CD4	5.78 \pm 0.66 ^a	84.56 \pm 18.19 ^{a*}
CD8	12.67 \pm 3.76 ^a	103.80 \pm 35.99 ^{a*}
CD20	6.22 \pm 1.04 ^a	116.90 \pm 26.29 ^{a*}
CD68	35.22 \pm 6.12 ^b	87.67 \pm 14.82 ^{a*}
S100	12.67 \pm 2.54 ^a	42.00 \pm 7.34 ^{a*}

Letras distintas, tanto entre filas como entre columnas, indican que existen diferencias significativas del número de células inmunocompetentes positivas ($p < 0.05$). El asterisco indica diferencias significativas de las zonas invasivas con respecto a las intratumorales.

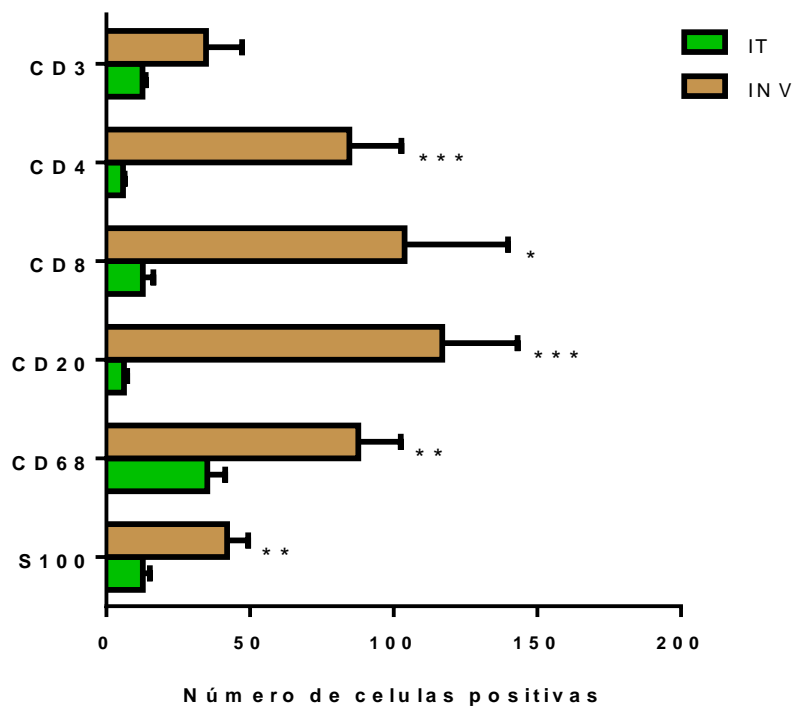
**Figura 8.** Adenocarcinoma ductal. IT: intratumoral; INV: invasivo.

Fig. 9. Adenocarcinoma ductal: Células inmunocompetentes intratumorales

- a) Patrón multiquístico con formaciones papilares. Hematoxilina - Eosina.
- b) Quiste con carcinoma ductal bien diferenciado y evidente patrón cribiforme. Hematoxilina - Eosina.
- c) Infiltración de linfocitos T entre las células tumorales. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- d) Los linfocitos T inmunomarcados se localizan en la vecindad de células tumorales necrobióticas. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- e-f) Los linfocitos T auxiliares son escasos entre las células tumorales. Anti- CD4 - Hematoxilina.
- g) Tumor indiferenciado con reacción desmoplásica en la que se identifican linfocitos CD8+. Inset: el inmunomarcaje presenta un característico patrón de membrana. Anti- CD68 - Hematoxilina.
- h-i) Entre las células tumorales pobremente diferenciadas se pueden identificar linfocitos B. Anti- CD20 - Hematoxilina.
- j-k) Los macrófagos son muy abundantes en las zonas de necrosis y también infiltrando células tumorales viables. Anti- CD68 - Hematoxilina.
- l) Las células dendríticas mayoritariamente se encuentran en el tejido fibroso que rodea a los nidos tumorales. Anti- S100 - Hematoxilina.

Adenocarcinoma Ductal Salivar

Células inmunocompetentes intratumorales

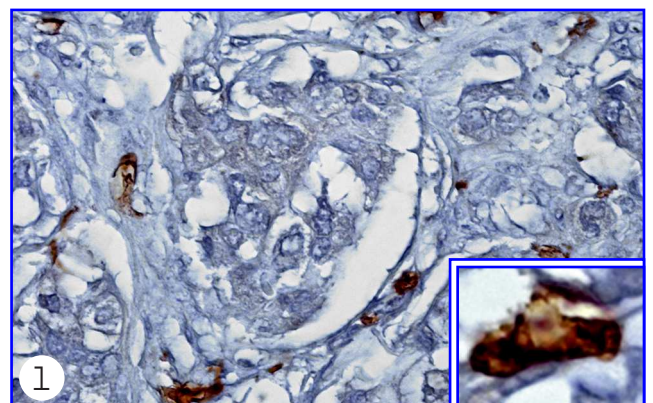
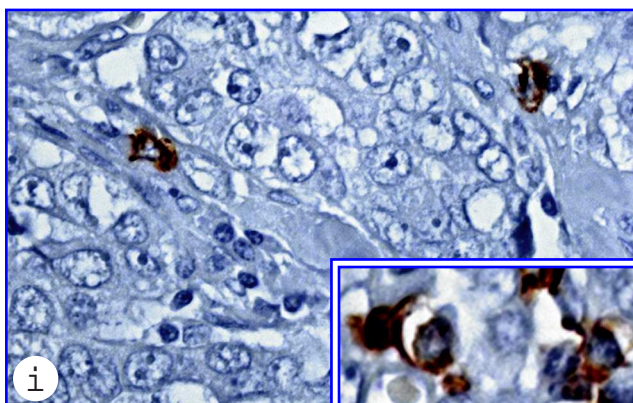
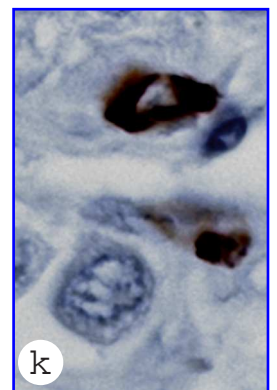
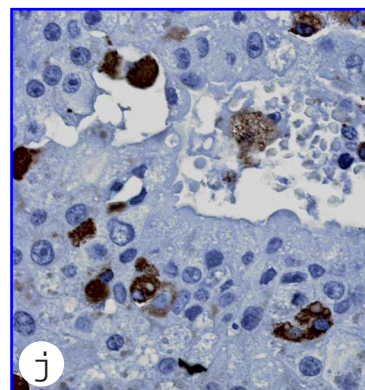
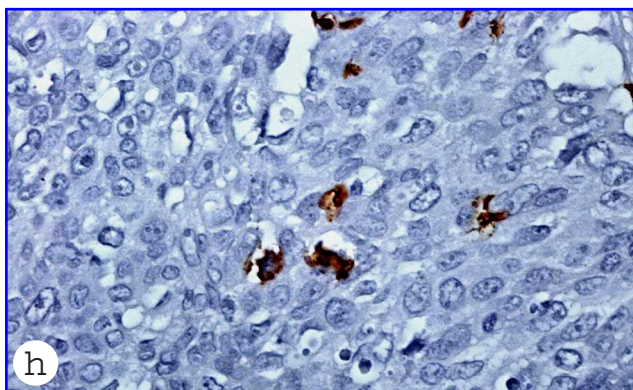
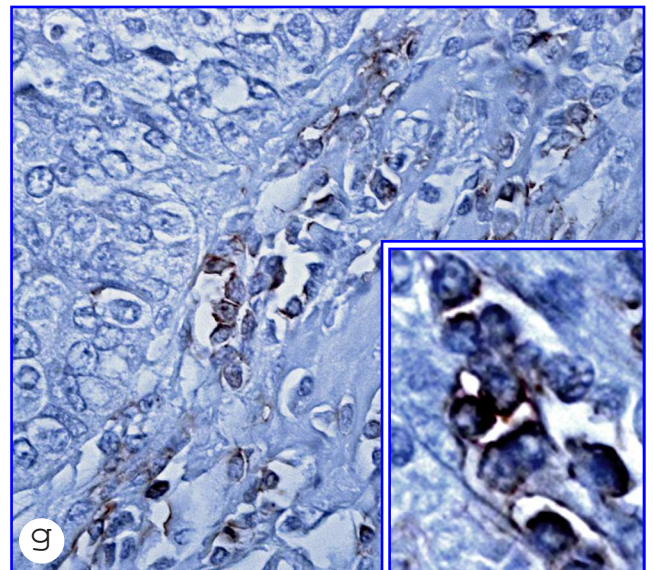
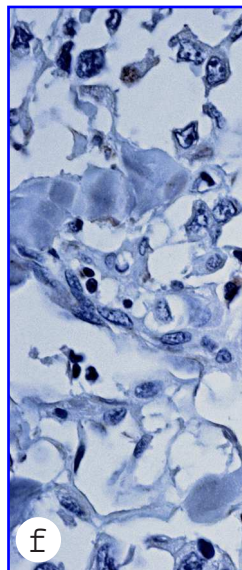
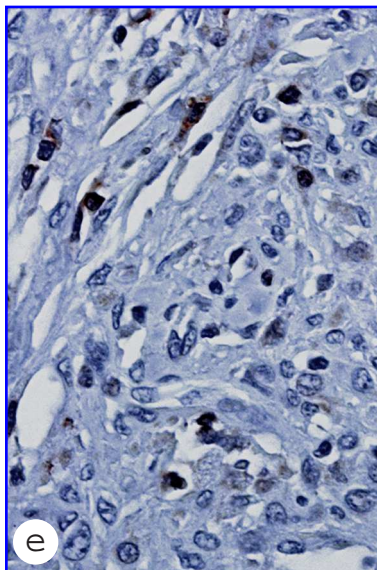
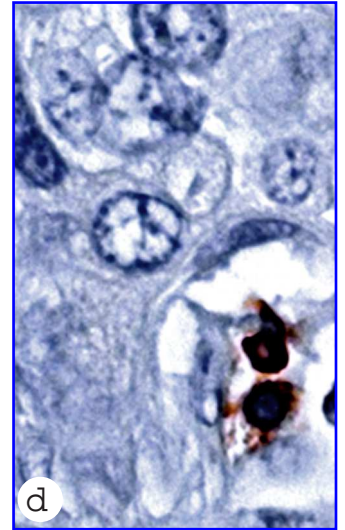
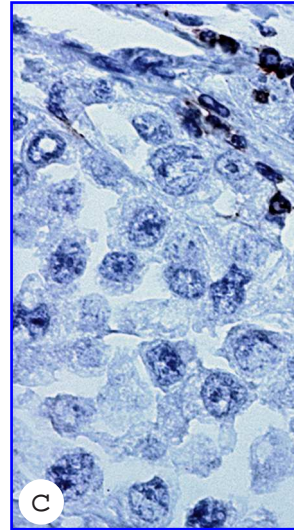
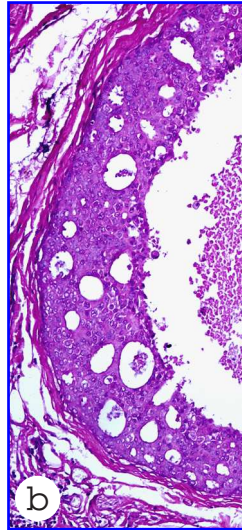
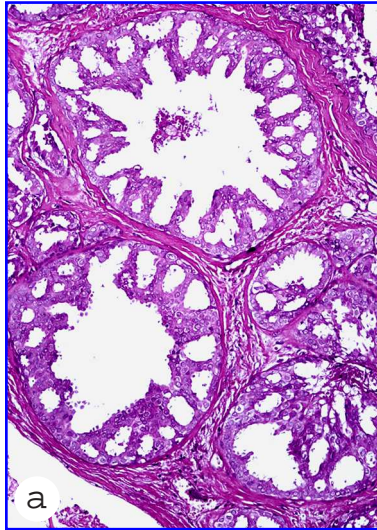
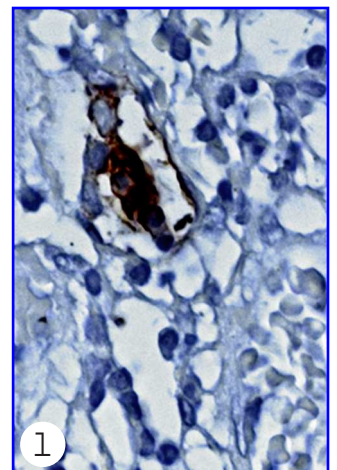
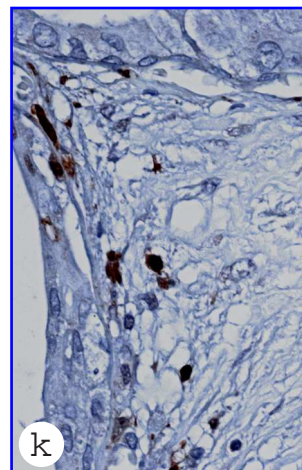
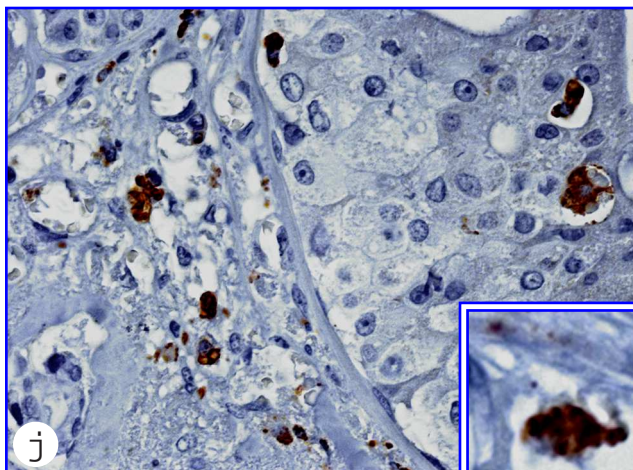
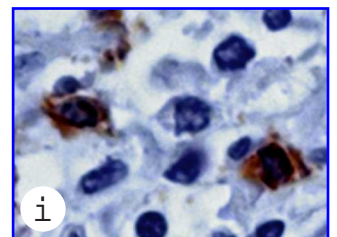
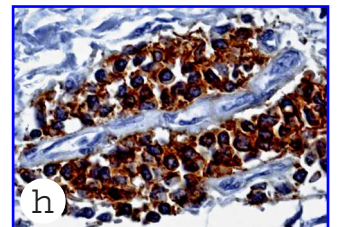
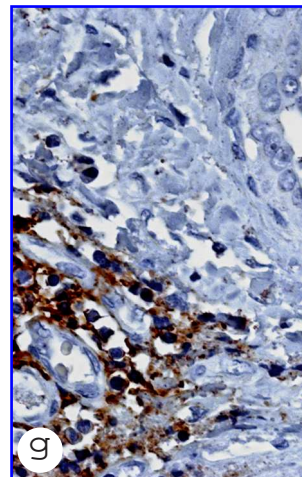
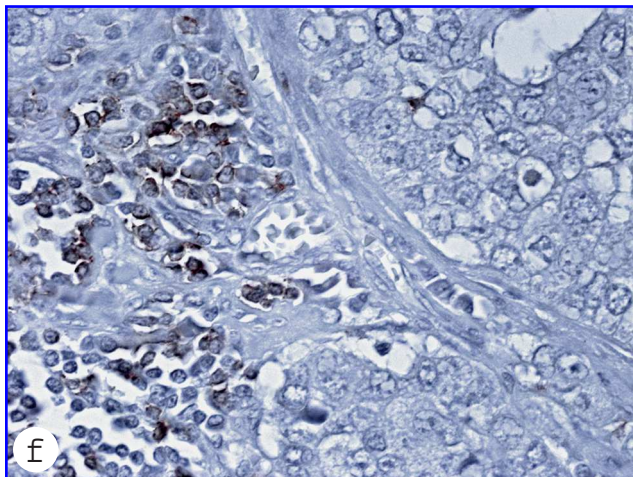
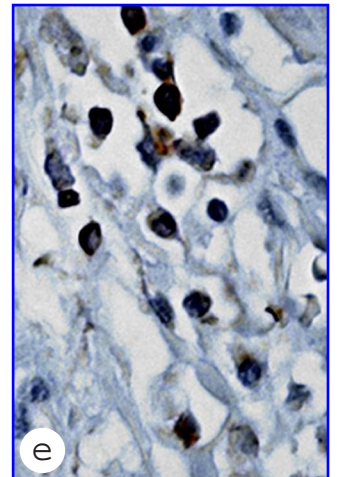
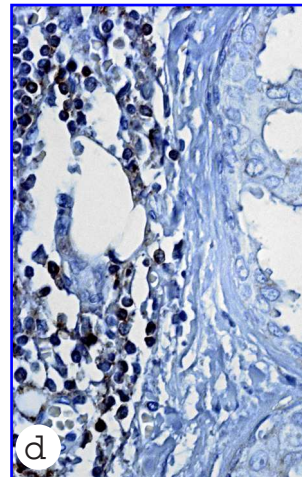
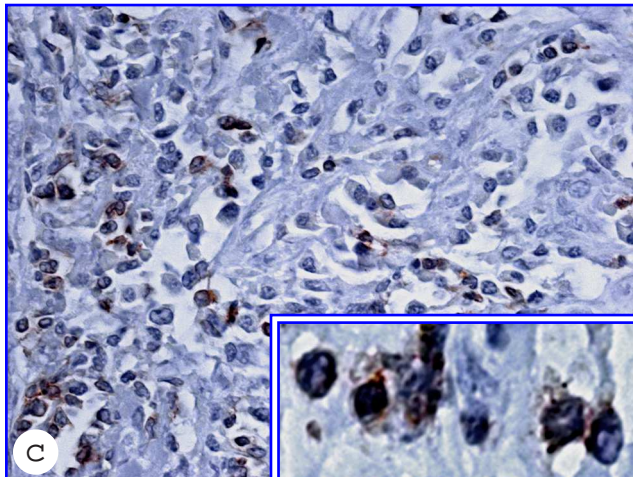
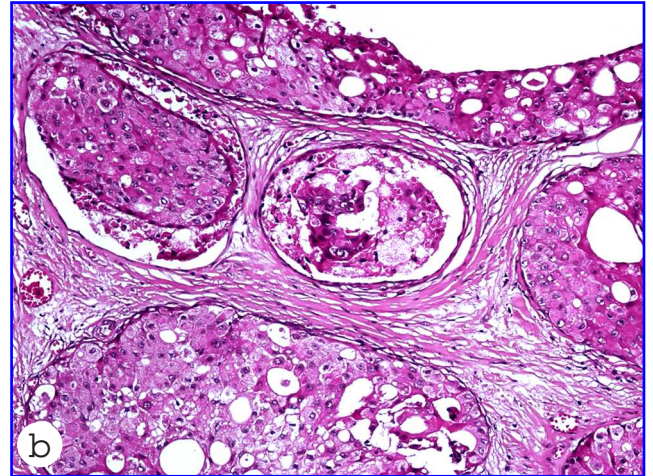
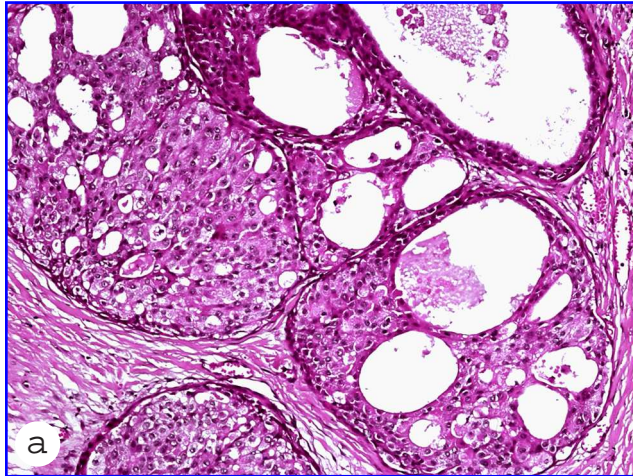


Fig. 10. Adenocarcinoma ductal: Células inmunocompetentes en zona de invasión

- a-b)** Espectro de patrones microglandular, quístico y sólido del carcinoma ductal. Rodeando a las masas tumorales se disponen amplias áreas de necrosis con importante reacción desmoplásica e infiltrados inflamatorios. Hematoxilina - Eosina.
- c)** En la zona de invasión tumoral la respuesta inflamatoria es muy abundante y predominan infiltrados difusos de linfocitos T CD3+. Inset: inmunoexpresión en la membrana citoplasmática de CD3 en los linfocitos T. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- d-e)** Los linfocitos T auxiliares son abundantes en las áreas de infiltración y se identifican por la expresión en la membrana citoplasmática de CD4. Anti- CD4 - Hematoxilina.
- f)** Acúmulo de linfocitos T CD8+, aunque la distribución en la mayoría de los adenocarcinomas ductales es muy irregular. Anti- CD8 - Hematoxilina.
- g-i)** Múltiples nidos de linfocitos B en las áreas infiltrantes del tumor. Nótese la expresión intracitoplasmática de este epítipo. Anti- CD20 - Hematoxilina.
- j)** Los macrófagos peritumorales se incrementan en las zonas de necrosis, aunque también se pueden observar en la íntima vecindad de las células del carcinoma ductal. Inset: abundantes lisosomas CD68+ en un macrófago que fagocita material necrosado. Anti- CD68 - Hematoxilina.
- k-l)** Las células dendríticas S100+ son escasas y generalmente se asocian a linfocitos en las áreas desmoplásicas de infiltración tumoral. Anti- S100 - Hematoxilina.

Adenocarcinoma Ductal Salivar

Células inmunocompetentes en zona de invasión



Carcinoma Mucoepidermoide

Nuestra serie confirma que uno de los tumores malignos más frecuente de glándulas salivares es el carcinoma mucoepidermoide, habiendo realizado este diagnóstico en 20 pacientes. De estos pacientes, 11 casos se han clasificado como carcinoma epidermoide de alto grado de malignidad, y 9 casos fueron carcinomas mucoepidermoides de bajo grado. En la tabla 6 se reflejan las cuantificaciones absolutas y su significación estadística de los diferentes tipos de células inmunocompetentes en los nódulos tumorales y en las zonas de invasión. Destaca una masiva infiltración de células inmunocompetentes en la zona de invasión tumoral con respecto a los nódulos tumorales principales, siendo los datos altamente significativos para todos los linfocitos inmunomarcados y también para los macrófagos (Tabla 9 y Fig. 11). Las comparaciones del número de células positivas para los diferentes marcadores en la zona intratumoral no han determinado diferencias significativas, salvo un mayor número de macrófagos ($p < 0.05$) (Tabla 9 y Fig. 11).

En los carcinomas mucoepidermoides de alto grado la distribución de células inmunocompetentes asimismo es mucho mayor en las zonas de invasión tumoral; además, en estas áreas hay un significativo mayor número de linfocitos T que de linfocitos B (Tabla 10 y Fig. 12). El análisis estadístico del número de células inmunomarcadas con los diferentes anticuerpos, dado el escaso número de células inmunocompetentes presentes en los nódulos tumorales principales, no ha determinado diferencias significativas.

En los carcinomas mucoepidermoides de bajo grado, los valores numéricos de cada una de las células inmunocompetentes en las áreas de invasión es notoriamente inferior con respecto al observado en el grupo de alto grado. Además, en los casos de bajo grado no se han encontrado diferencias significativas entre los diferentes tipos de células inmunocompetentes (Tabla 11 y Fig. 13). Por el contrario, en todos los marcadores el número de células positivas es significativamente superior en la zona de invasión con respecto a la zona intratumoral, en la cual siguen siendo muy escasos los linfocitos y macrófagos asociados a las células tumorales.

Tabla 9. Carcinoma mucoepidermoide (Media \pm SEM, n=20).

Marcador	Intratumoral	Invasivo
CD3	25.75 \pm 5.92 ^a	392.10 \pm 66.53 ^b
CD4	21.47 \pm 4.20 ^a	403.40 \pm 53.15 ^b
CD8	23.21 \pm 4.71 ^a	323.10 \pm 40.53 ^b
CD20	11.00 \pm 2.24 ^a	276.60 \pm 47.66 ^b
CD68	40.84 \pm 4.99 ^c	151.60 \pm 17.91 ^d
S100	28.65 \pm 5.46 ^a	52.50 \pm 6.37 ^d

Letras distintas, tanto entre filas como entre columnas, indican que existen diferencias significativas del número de células inmunocompetentes positivas ($p < 0.05$).

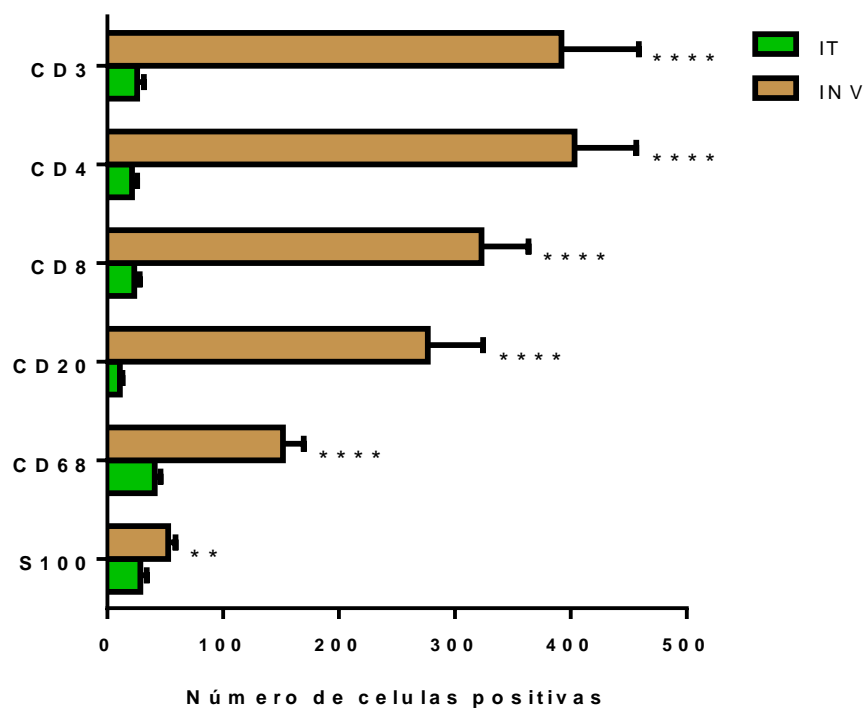
**Figura 11.** Carcinoma mucoepidermoide. IT: intratumoral; INV: invasivo.

Tabla 10. Carcinoma mucoepidermoide de alto grado (media \pm SEM, n=11).

Marcador	Intratumoral	Invasivo
CD3	37.82 \pm 9.01 ^a	553.20 \pm 92.21 ^b
CD4	25.30 \pm 7.52 ^a	433.00 \pm 93.24 ^b
CD8	20.00 \pm 6.39 ^a	351.10 \pm 68.93 ^b
CD20	12.50 \pm 2.89 ^a	222.40 \pm 53.93 ^c
CD68	34.80 \pm 5.06 ^a	123.50 \pm 19.92 ^c
S100	31.45 \pm 7.88 ^a	58.55 \pm 9.39 ^c

Letras distintas, tanto entre filas como entre columnas, indican que existen diferencias significativas del número de células inmunocompetentes positivas ($p < 0.05$).

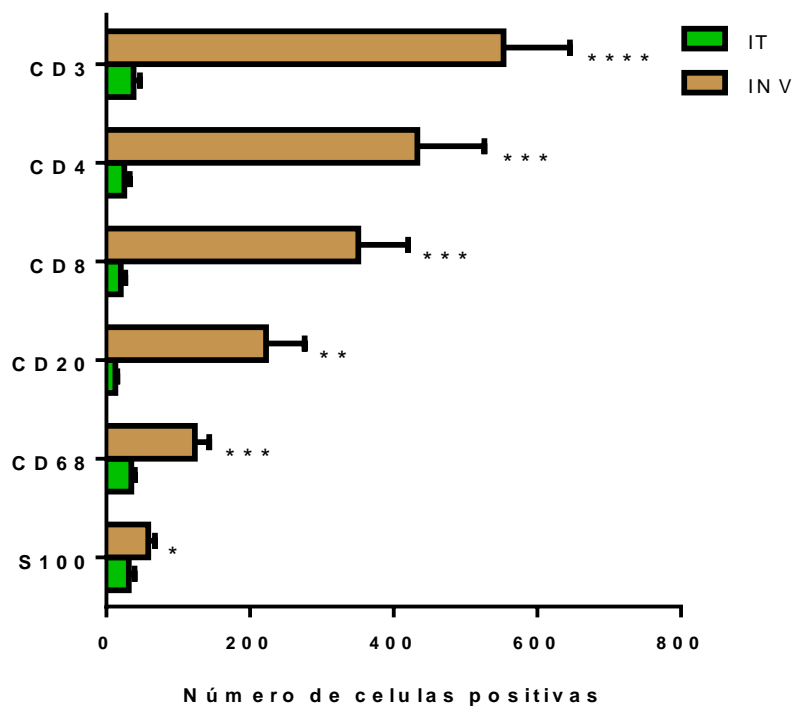
**Figura 12.** Carcinoma mucoepidermoide de alto grado.

Tabla 11. Carcinoma mucoepidermoide de bajo grado (media \pm SEM, n=9).

Marcador	Intratumoral	Invasivo
CD3	11.00 \pm 3.39 ^a	195.10 \pm 39.47 ^c
CD4	17.22 \pm 2.96 ^a	370.60 \pm 47.92 ^c
CD8	26.78 \pm 7.18 ^a	292.00 \pm 40.45 ^c
CD20	9.33 \pm 3.57 ^a	336.90 \pm 79.32 ^c
CD68	47.56 \pm 8.70 ^b	182.90 \pm 28.19 ^c
S100	25.22 \pm 7.73 ^a	45.11 \pm 8.20 ^a

Letras distintas, tanto entre filas como entre columnas, indican que existen diferencias significativas del número de células inmunocompetentes positivas ($p < 0.05$).

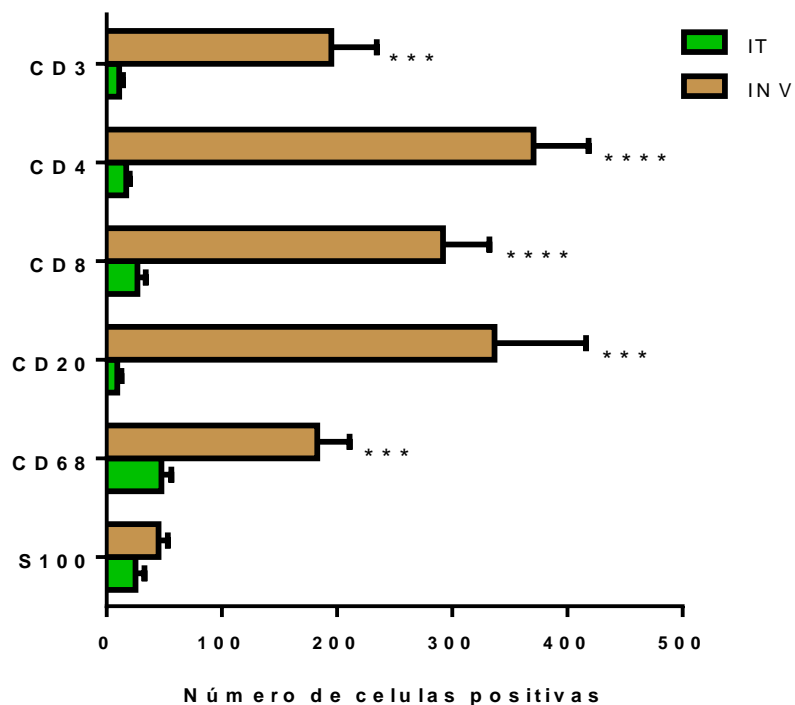
**Figura 13.** Carcinoma mucoepidermoide de bajo grado. IT: intratumoral; INV: invasivo.

Fig. 14. Carcinoma mucoepidermoide: Patrones histológicos bien y pobremente diferenciado

- a) Interfase entre la glándula salivar normal (zona superior) y un carcinoma mucoepidermoide de bajo grado separado por una gruesa cápsula de tejido conjuntivo. Hematoxilina - Eosina.
- b) Las células tumorales son grandes y microvacuoladas, forman acinos glandulares, y revisten formacionesseudopapilares. Hematoxilina - Eosina.
- c-d) Tumor bien diferenciado caracterizado por una proliferación difusa de células eosinófilas asociado a glándulas y microquistes tapizados por células mucinosas bien diferenciadas. Hematoxilina - Eosina.
- e-f) Patrón sólido yseudopapilar de un carcinoma mucoepidermoide de alto grado moderadamente diferenciado. Hematoxilina - Eosina.

Carcinoma Mucoepidermoide de Bajo y Alto Grado

Patrones Histológicos

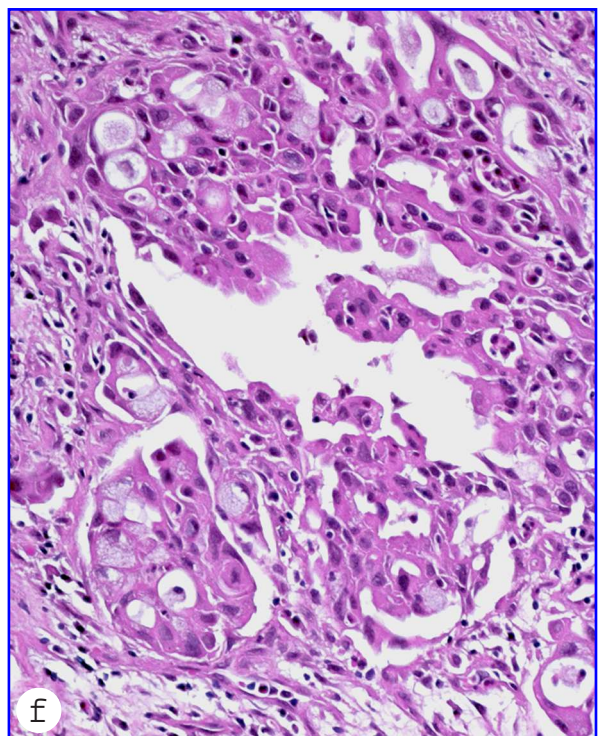
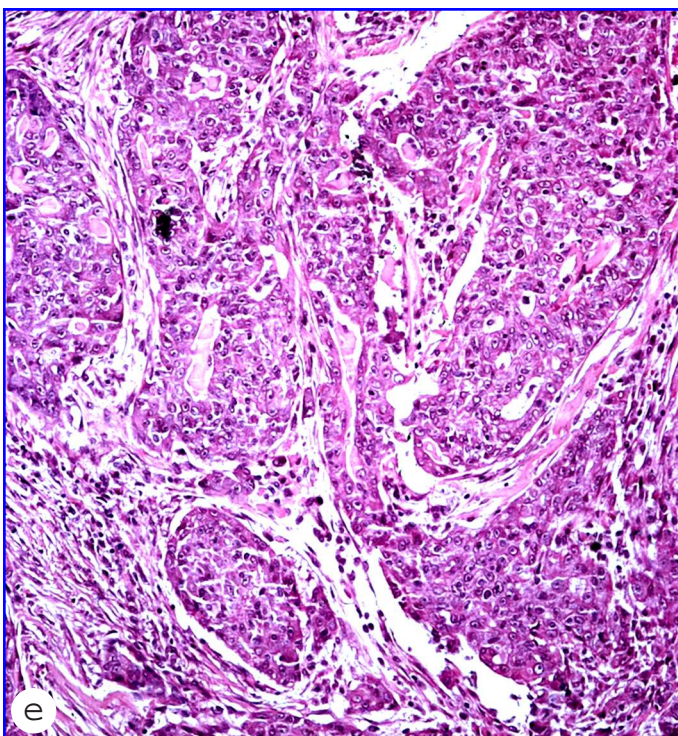
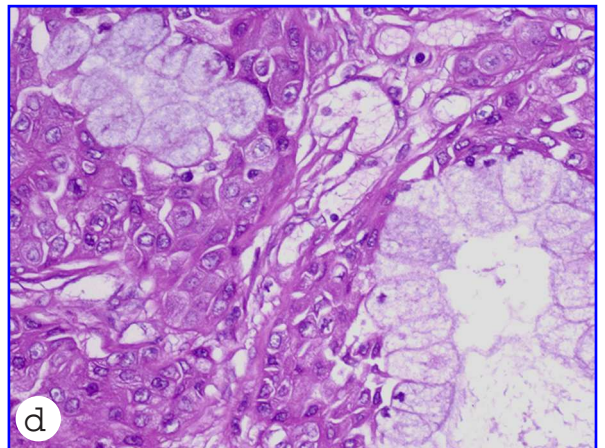
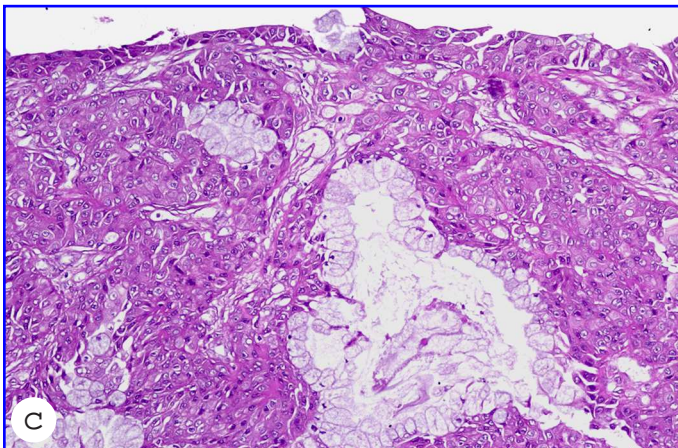
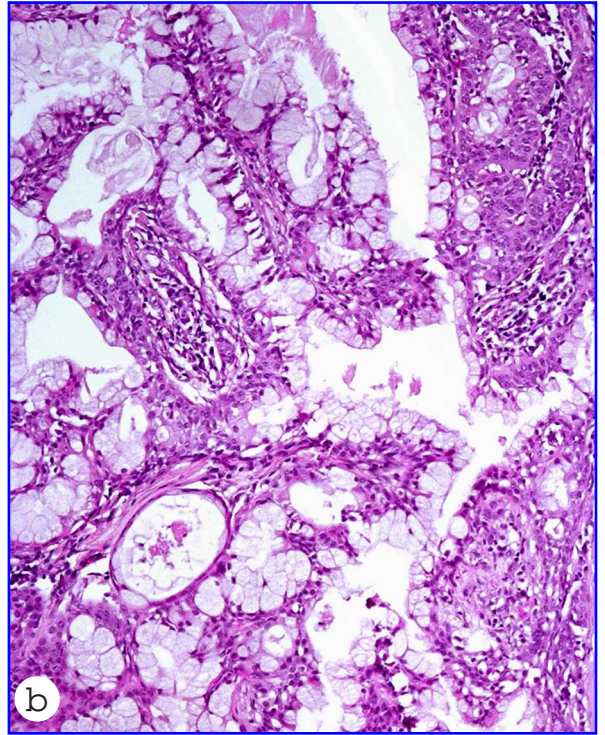
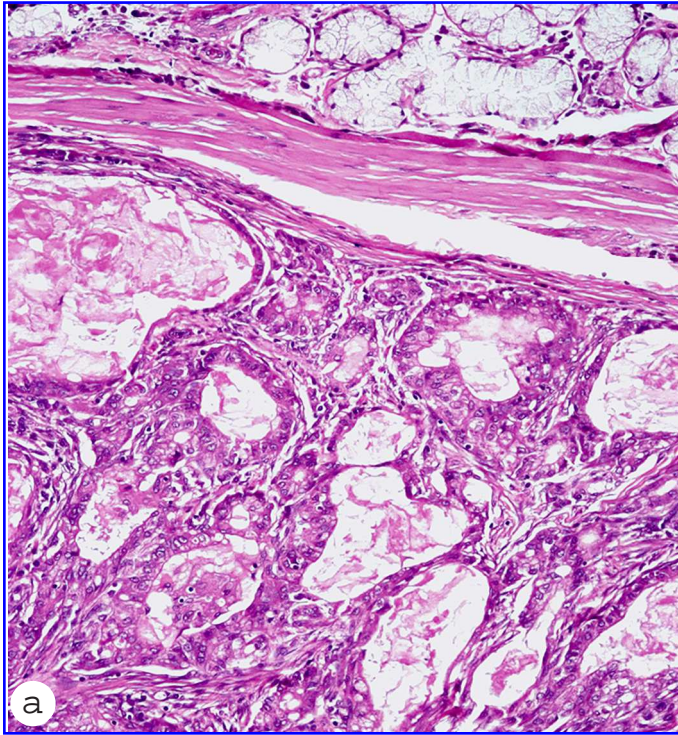


Fig. 15. Carcinoma mucoepidermoide: Células inmunocompetentes intratumorales

- a-b)** Abundantes linfocitos CD3+ entremezclados entre las células tumorales de un carcinoma epidermoide de alto grado. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- c-d)** Los linfocitos TCD4+ son muy evidentes entre las células tumorales desdiferenciadas de un carcinoma mucoepidermoide de alto grado. Anti- CD4 - Hematoxilina.
- e-f)** Formaciones glandulares bien diferenciadas de un carcinoma mucoepidermoide de bajo grado con abundantes linfocitos Cd8+ en el intersticio periglandular. Anti- CD8 - Hematoxilina.
- g)** Patrón sólido difuso pobremente diferenciado de un carcinoma mucoepidermoide de alto grado. Se observan linfocitos que expresan el epítipo CD20 asociados a otros linfocitos rigurosamente negativos. Anti- CD20 - Hematoxilina.
- h)** En los focos de necrosis de los carcinomas mucoepidermoides es evidente la migración de linfocitos B. Anti- CD20 - Hematoxilina.
- i)** Los linfocitos B CD20+ excepcionalmente forman una corona periférica alrededor de las glándulas tumorales. Anti- CD20 - Hematoxilina.
- j-k)** Macrófagos CD68 migrando entre las células tumorales de un carcinoma mucoepidermoide de alto grado. Inset: todos los macrófagos de la imagen presentan abundantes lisosomas inmunoteñidos. Anti- CD68 - Hematoxilina.
- l)** Carcinoma mucoepidermoide de alto grado con patrón sólido y células poco diferenciadas, entremezcladas con células dendríticas S100+. Anti- S100 - Hematoxilina.

Carcinoma Mucoepidermoide

Células inmunocompetentes intratumorales

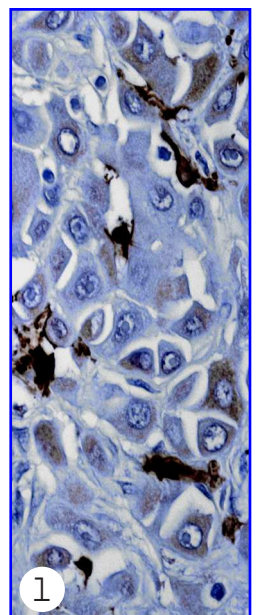
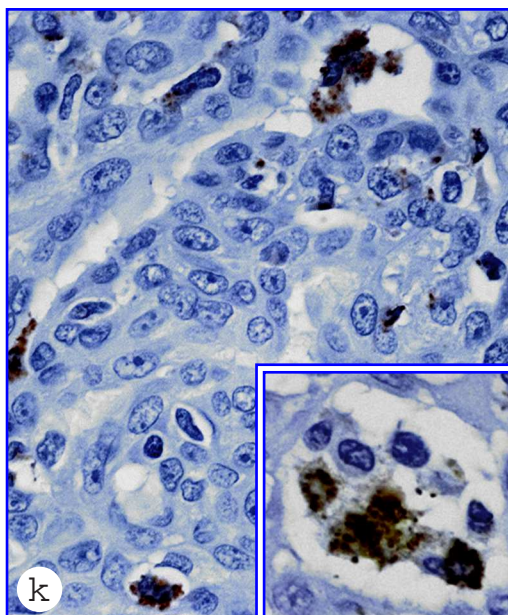
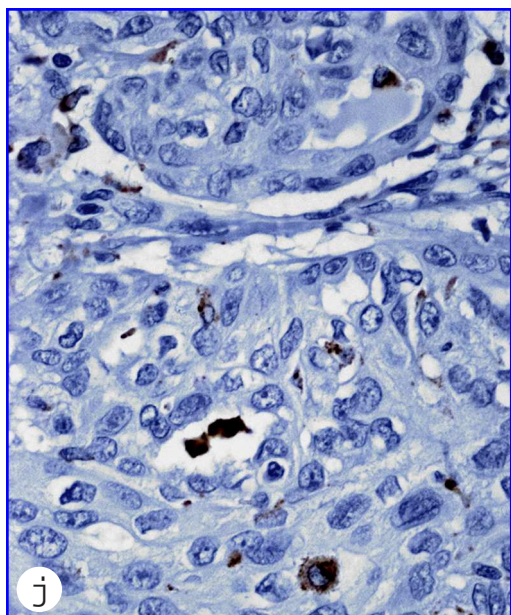
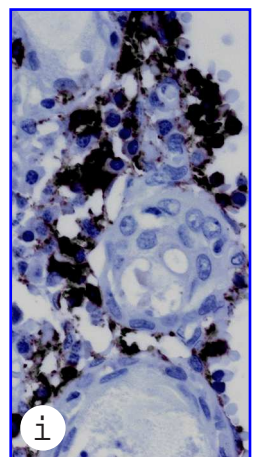
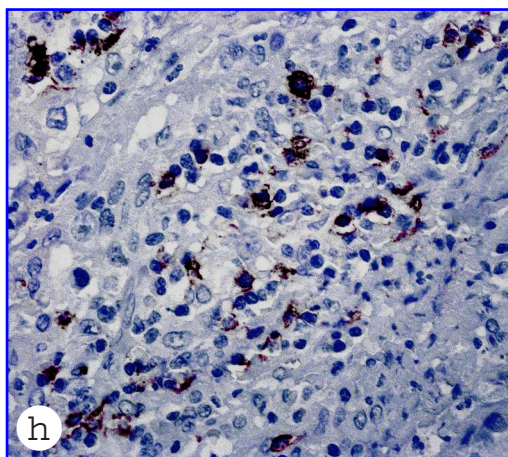
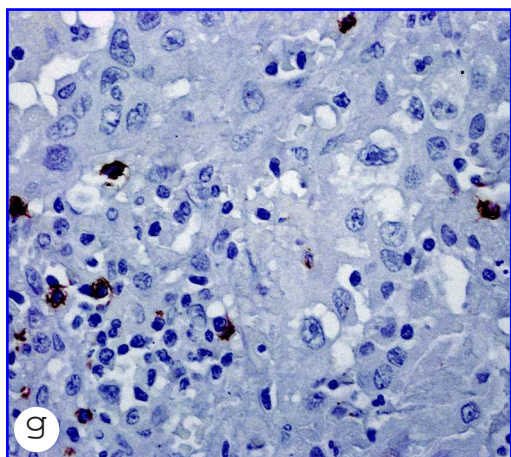
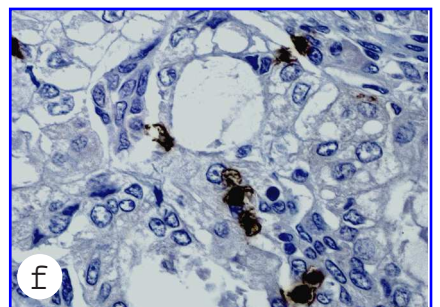
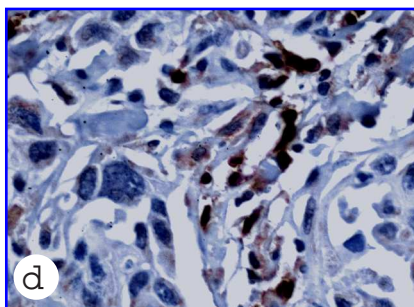
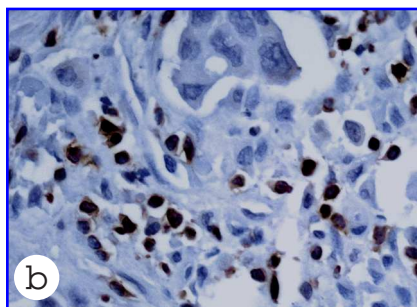
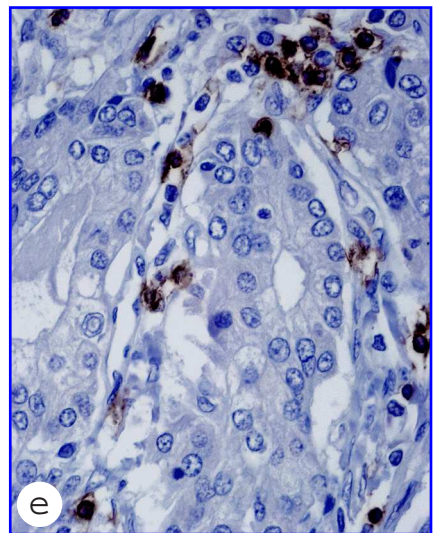
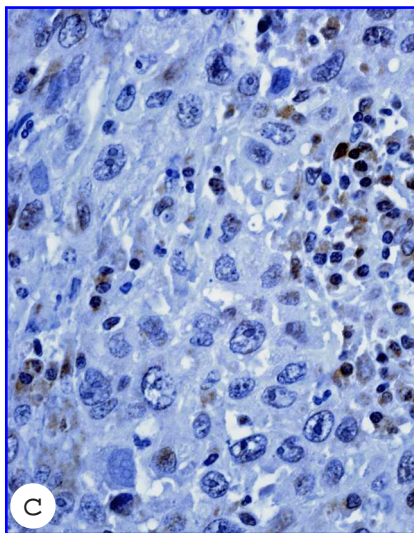
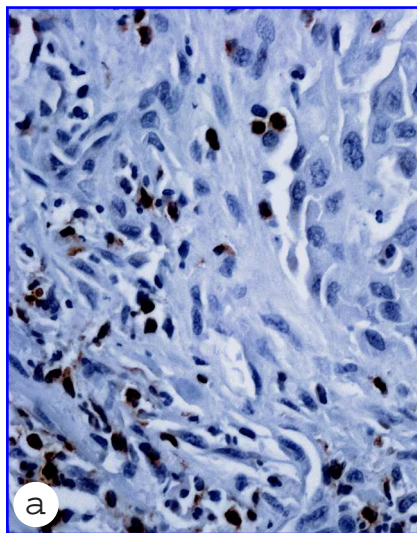
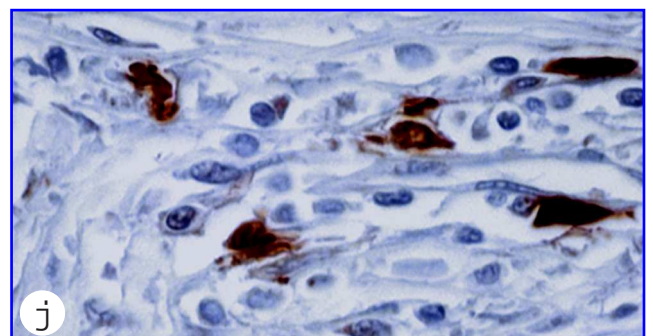
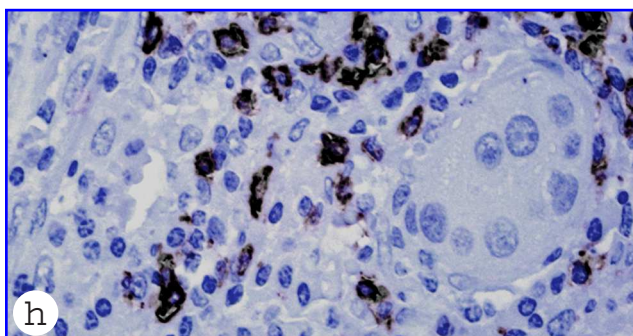
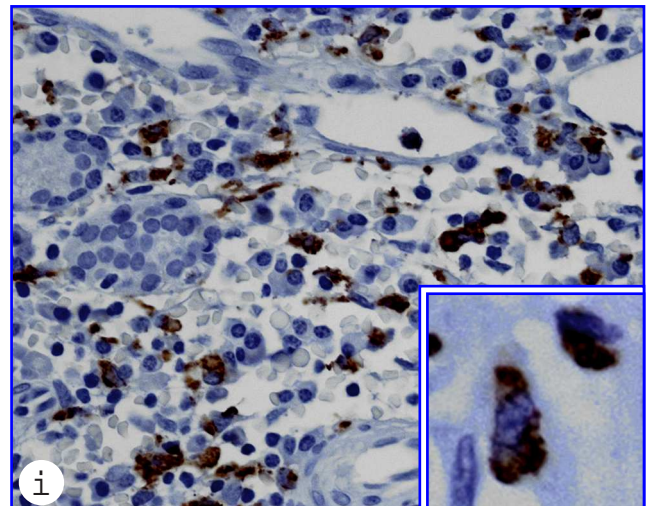
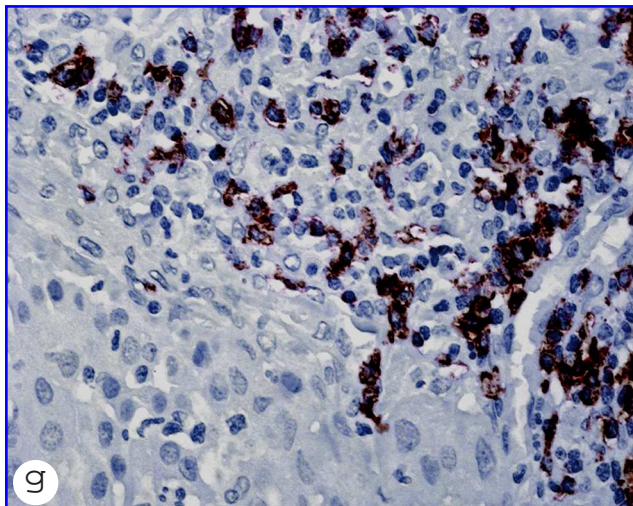
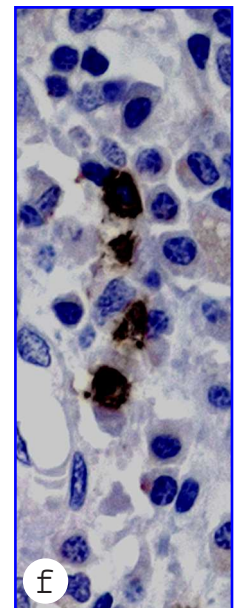
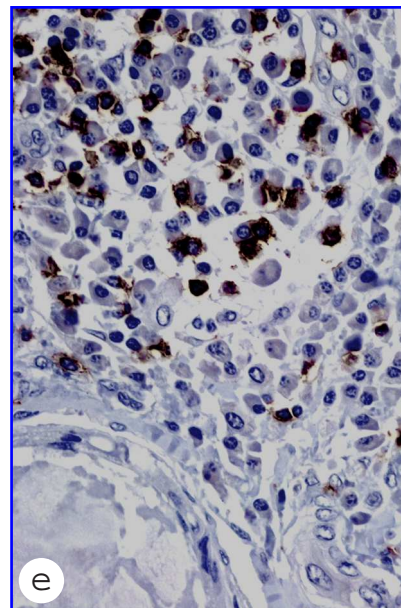
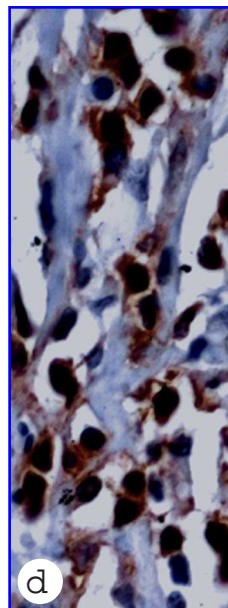
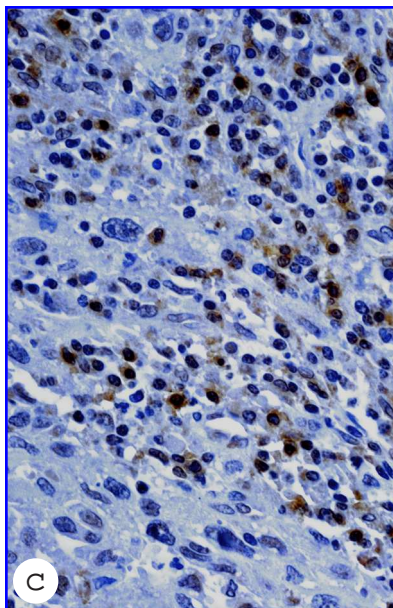
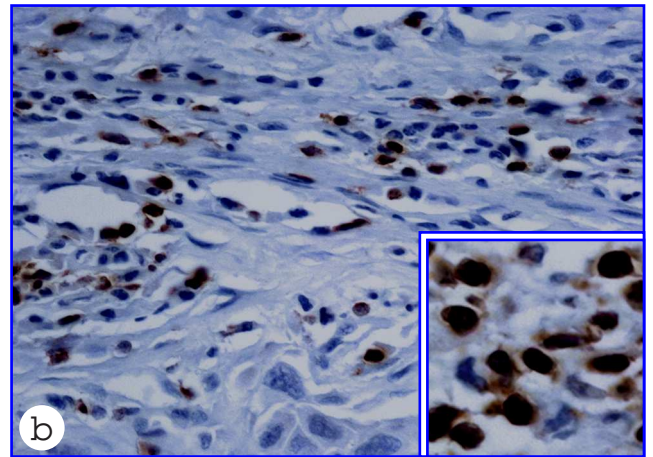
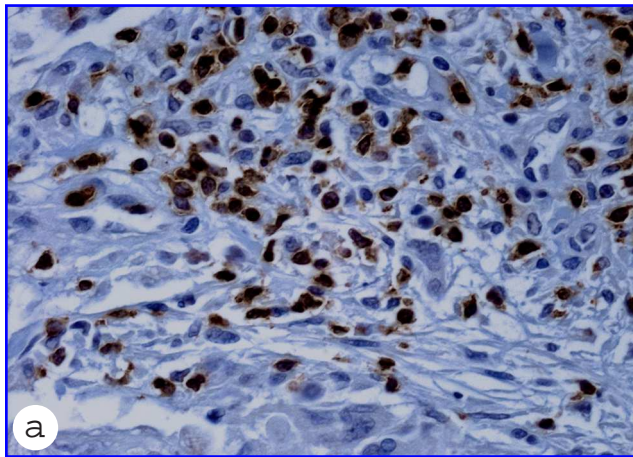


Fig. 16. Carcinoma mucoepidermoide: Células inmunocompetentes en zona de invasión

- a-b)** En la zona de invasión del tumor y en el tejido desmoplásico adyacente existen abundantes células inmunocompetentes, siendo muy numerosos los linfocitos T CD3+. Inset: intenso inmunomarcaje de CD3 en la membrana citoplasmática de los linfocitos T. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- c-d)** La detección del epítipo Cd4 permite distinguir los linfocitos T auxiliares de otras células inmunocompetentes muy abundantes en la periferia del tumor.. Anti- CD4 - Hematoxilina.
- e-f)** Algunos linfocitos en las áreas de invasión son linfocitos CD8+. Anti- CD8 - Hematoxilina.
- g-h)** Zona desmoplásica en íntima vecindad de un carcinoma mucoepidermoide moderadamente diferenciado con masiva infiltración de linfocitos B CD20+. Anti- CD20 - Hematoxilina.
- i)** Zona abcesificada peritumoral con macrófagos CD68+. Inset: macrófagos con vacuolas citoplasmáticas y lisosomas CD68+ que fagocitan material necrótico tumoral. Anti- CD68 - Hematoxilina.
- j)** Necrosis del tejido conjuntivo peritumoral en el que se evidencian numerosos infiltrados de linfocitos y abundantes células dendríticas con robusta inmunoexpresión de S100 en su citoplasma. Anti- S100 - Hematoxilina.

Carcinoma Mucoepidermoide

Células inmunocompetentes en zona de invasión



Carcinoma Epitelial-Mioepitelial

En la clasificación internacional actual de los tumores malignos de glándulas salivares, se incluye el diagnóstico específico de la entidad carcinoma epitelial-mioepitelial. La re-evaluación diagnóstica de nuestro archivo ha permitido incluir cinco casos con este diagnóstico.

En los nódulos tumorales se confirma el extraordinariamente bajo número de células inmunocompetentes entre las células malignas, tanto en las áreas de proliferación epitelial, como en las que predomina la proliferación de células mioepiteliales. No existen diferencias significativas entre los distintos inmunofenotipos estudiados, salvo un mayor número de macrófagos entre las células tumorales (Tabla 12 y Fig. 17).

El patrón de células inmunocompetentes en las zonas de invasión tumoral en los carcinomas epiteliales-mioepiteliales sigue la misma tendencia que la observada en otros tipos histológicos de tumores malignos de glándulas salivares. En efecto, el número de linfocitos T CD4+ y CD8+ en las zonas de infiltración es significativamente mayor; Lo mismo ocurre con el altísimo número de linfocitos B en la zona periférica del tumor. Es de destacar que en estas áreas el número de macrófagos es idéntico al encontrado en el centro del tumor, y tampoco se han encontrado diferencias significativas en el número de células dendríticas S100+ cuando se cuantifican en el centro y en la zona invasiva del tumor (Tabla 12 y Fig. 17).

Tabla 12. Carcinoma epitelial-mioepitelial (media \pm SEM, n=5).

Marcador	Intratumoral	Invasivo
CD3	17.20 \pm 7.90 ^a	58.00 \pm 30.78 ^a
CD4	11.60 \pm 5.12 ^a	103.40 \pm 29.62 ^b
CD8	10.80 \pm 3.35 ^a	69.60 \pm 23.71 ^b
CD20	4.00 \pm 0.84 ^a	107.20 \pm 26.84 ^b
CD68	39.60 \pm 14.00 ^a	44.80 \pm 15.92 ^a
S100	27.20 \pm 13.22 ^a	26.00 \pm 2.24 ^a

Letras distintas, tanto entre filas como entre columnas, indican que existen diferencias significativas del número de células inmunocompetentes positivas ($p < 0.05$).

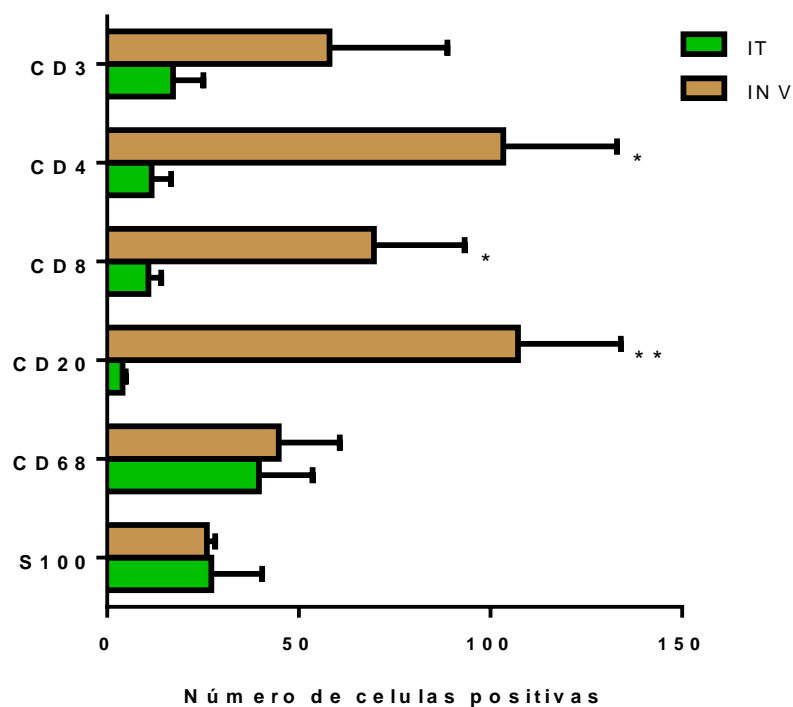
**Figura 17.** Carcinoma epitelial mioepitelial. IT: intratumoral; INV: invasivo.

Fig. 18. Carcinoma epitelial mioepitelial: Células inmunocompetentes intratumorales

- a) Proliferación difusa de células malignas de pequeño tamaño y escaso citoplasma. Hematoxilina - Eosina.
- b-c) Formación de estructuras tubulares pseudoglandulares en íntima vecindad de las células proliferantes diferenciadas las células proliferantes. Hematoxilina - Eosina.
- d) Escasos linfocitos CD3+ entremezclados con las células tumorales. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- e) En áreas de necrosis tumoral se observan acúmulos focales de linfocitos T. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- f-g) Linfocitos T auxiliares CD4+ entremezclados aisladamente entre las células mioepiteliales malignas. Anti- CD4 - Hematoxilina.
- h) Los linfocitos CD8+ son poco abundantes. Inset: intenso marcaje de membrana en un linfocito CD8. Anti- CD8 - Hematoxilina.
- i) Los linfocitos B CD20+ son muy escasos en la mayoría de los campos del interior del tumor. Inset: excepcionalmente se observan nidos de linfocitos B inmunomarcados. Anti- CD20 - Hematoxilina.
- j) Los macrófagos CD68+ son muy abundantes tanto en las zonas de necrosis como migrando entre las células tumorales. Anti- CD68 - Hematoxilina.
- k) Abundantes células dendríticas con múltiples prolongaciones y con intensa expresión de la proteína S100. Anti- S100 - Hematoxilina.

Carcinoma Epitelial Mioepitelial

Células inmunocompetentes intratumorales

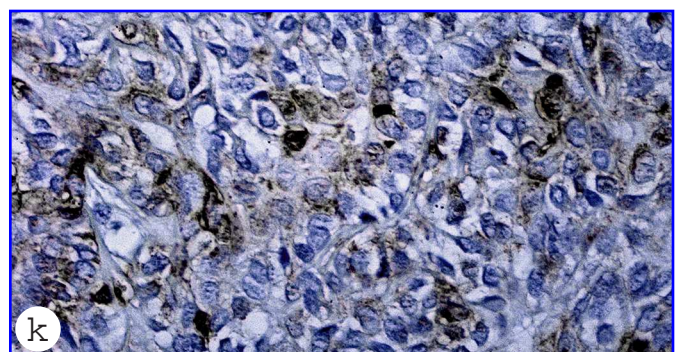
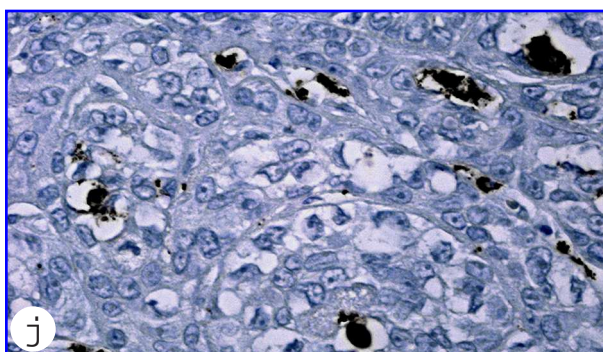
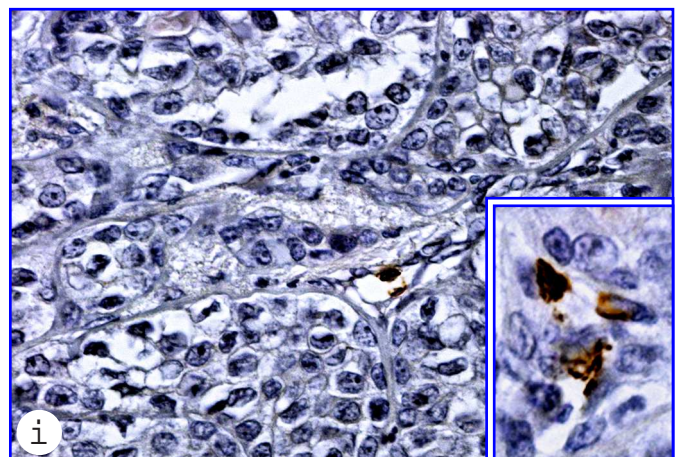
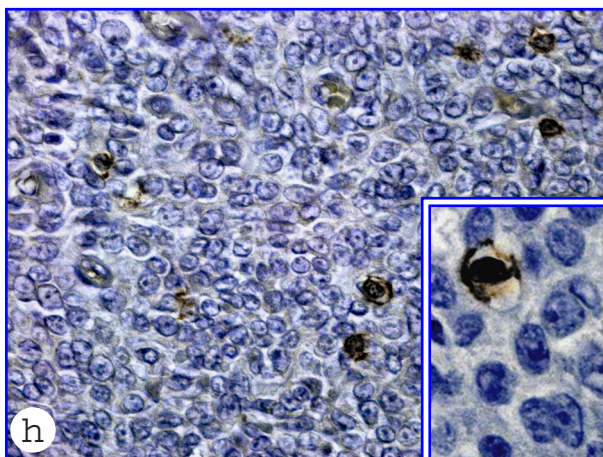
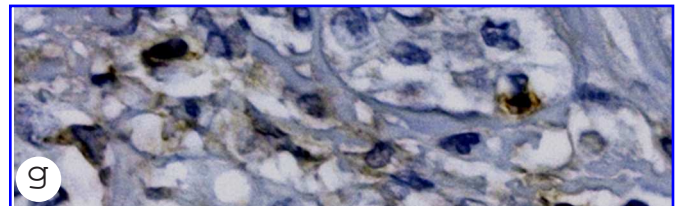
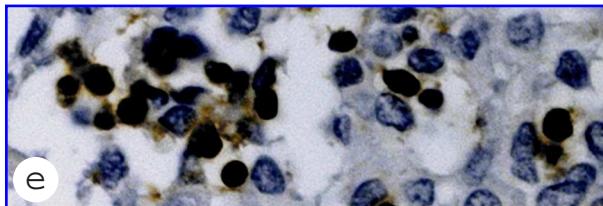
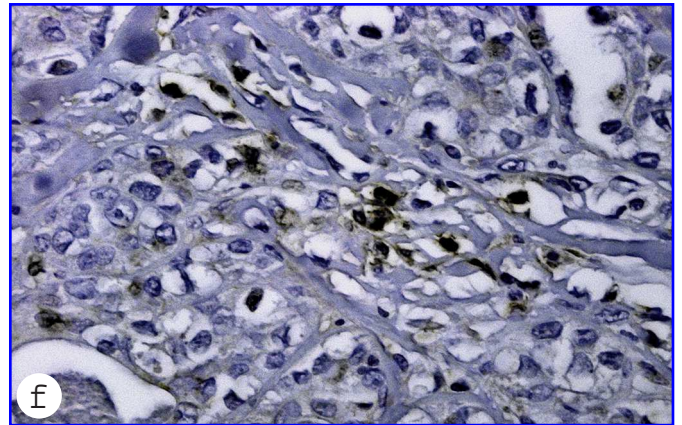
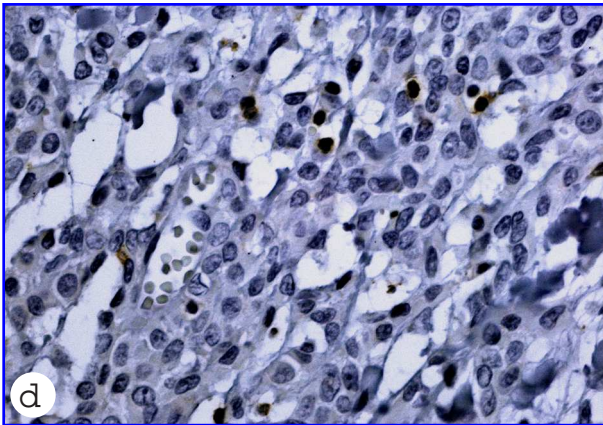
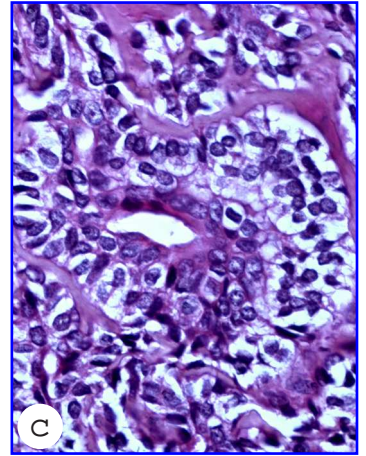
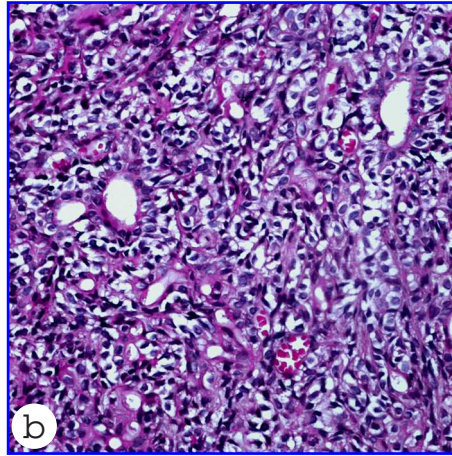
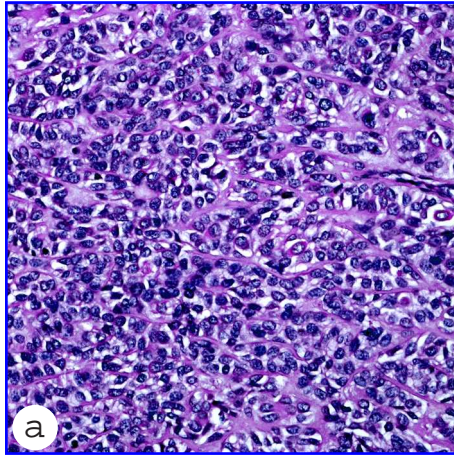
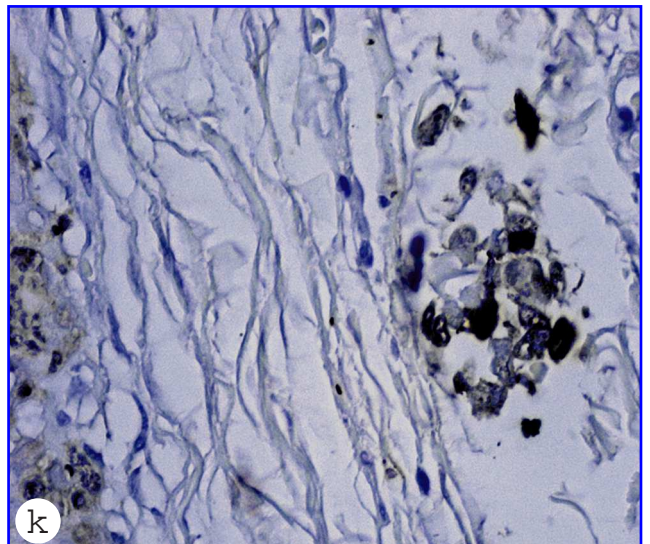
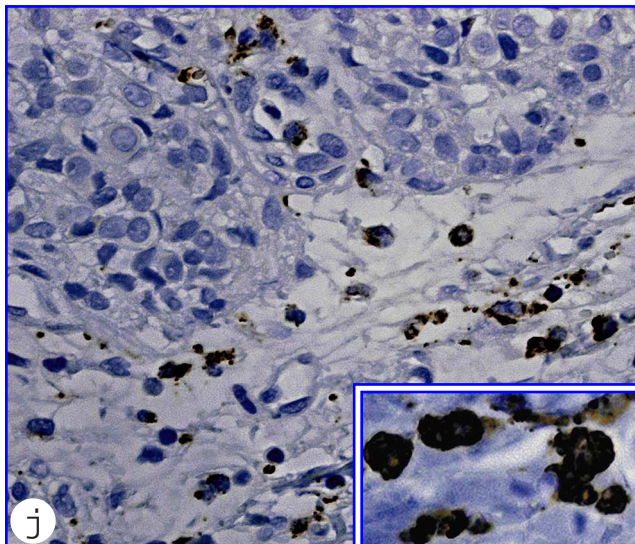
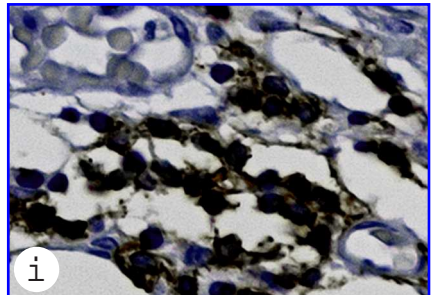
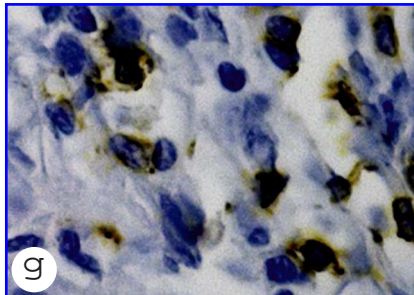
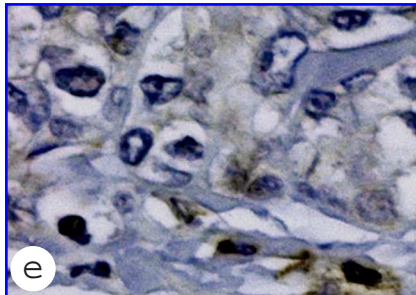
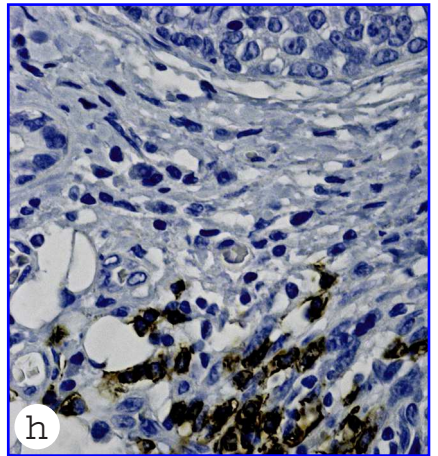
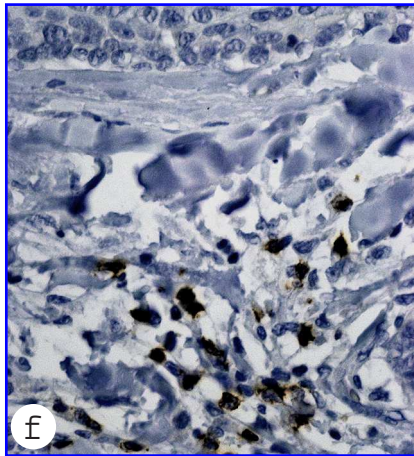
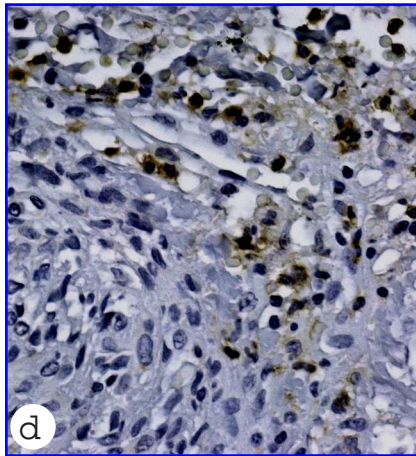
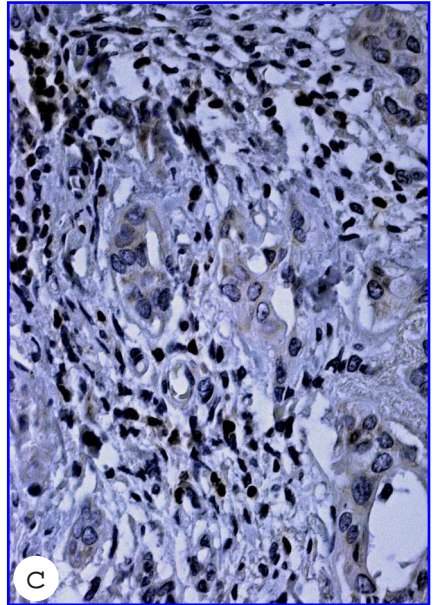
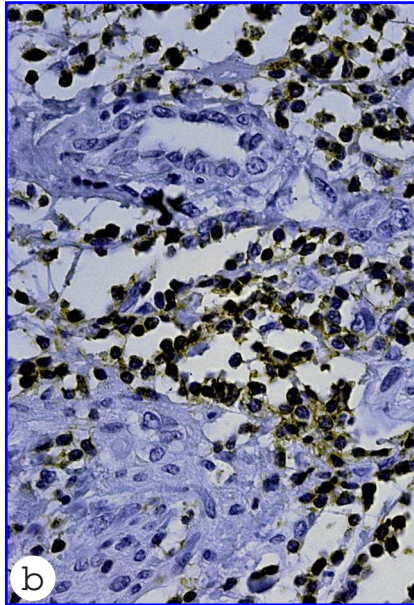
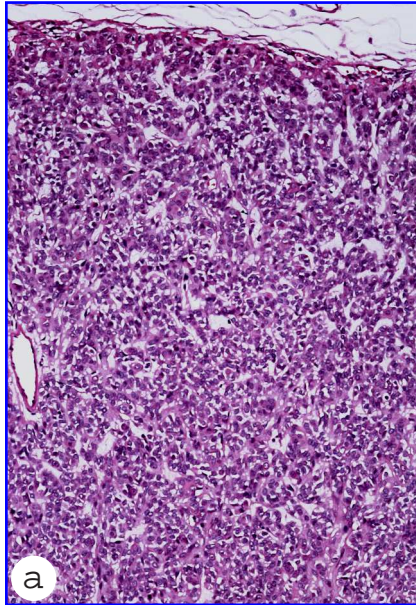


Fig. 19. Carcinoma epitelial mioepitelial: Células inmunocompetentes en zona de invasión

- a) Interfase entre la proliferación tumoral y el tejido conjuntivo adyacente. Nótese la presencia de una cápsula extraordinariamente delgada. Hematoxilina - Eosina.
- b-c) Los linfocitos T CD3+ son muy abundantes en el frente de infiltración tumoral y se disponen en pequeños nidos o infiltrando difusamente. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- d-e) Se observan numerosos linfocitos T CD4+ en la periferia de las masas tumorales. Anti- CD4 - Hematoxilina.
- f-g) En el tejido desmoplásico que rodea a los nódulos tumorales también es evidente la infiltración de linfocitos CD8+. Anti- CD8 - Hematoxilina.
- h-i) En el tejido conjuntivo que rodea al tumor se pueden ver linfocitos B CD20+ formando pequeños acúmulos. Anti- CD20 - Hematoxilina.
- j) En la periferia del tumor es frecuente observar infiltrados de macrófagos CD68+. Inset: intenso inmunomarcaje de CD68 en los lisosomas de los macrófagos peritumorales. Anti- CD68 - Hematoxilina.
- k) Las células dendríticas S100+ son constantes en el tejido desmoplásico peritumoral. Anti- S100 - Hematoxilina.

Carcinoma Epitelial Mioepitelial

Células inmunocompetentes en zona de invasión



Adenocarcinoma Polimorfo

Los adenocarcinomas polimorfos son tumores malignos de glándulas salivares considerados de bajo grado de malignidad. Este tumor es infrecuente y en nuestra serie sólo hemos encontrado tres pacientes por lo que las cuantificaciones de las células inmunocompetentes permiten describir el perfil de su inmunofenotipo, pero la valoración de la significación estadística debe ser considerada preliminar.

Con todo, en este tumor de bajo grado también destaca un evidente mayor número de células inmunocompetentes en las zonas periféricas del tumor, tanto en las áreas de invasión con respuesta desmoplásica, como en aquellas de invasión directa a la cápsula tumoral o a los lobulillos de la glándula salivar adyacente. En estas zonas de invasión existe un número similar de linfocitos B y T, y aunque hay un mayor número de macrófagos CD68+ las diferencias con respecto a las células linfoides no son significativas (Tabla 13 y Fig. 20).

El escasísimo número de linfocitos asociados a las células proliferantes de los nódulos tumorales principales no permite establecer diferencias significativas. Sin embargo, es de destacar que dentro del tumor existe un significativo mayor número ($p<0.05$) de macrófagos CD68+ que se disponen en la vecindad de las células tumorales malignas (Tabla 13 y Fig. 20).

Tabla 13. Adenocarcinoma polimorfo (media \pm SEM, n=3).

Marcador	Intratumoral	Invasivo
CD3	5.00 \pm 1.53 ^a	20.67 \pm 10.97 ^a
CD4	7.33 \pm 3.33 ^a	59.00 \pm 26.16 ^a
CD8	6.33 \pm 0.88 ^a	70.00 \pm 19.47 ^b
CD20	5.33 \pm 0.88 ^a	74.00 \pm 27.39 ^a
CD68	45.33 \pm 15.41 ^b	94.33 \pm 32.27 ^a
S100	15.33 \pm 3.28 ^a	28.67 \pm 5.17 ^a

Letras distintas, tanto entre filas como entre columnas, indican que existen diferencias significativas del número de células inmunocompetentes positivas ($p < 0.05$).

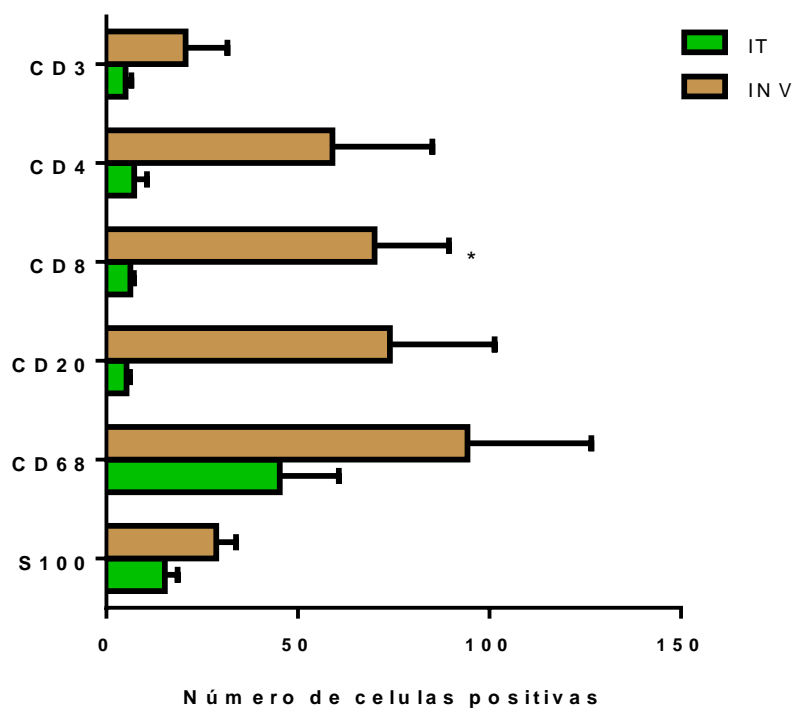
**Figura 20.** Adenocarcinoma polimorfo. IT: intratumoral; INV: invasivo.

Fig. 21. Carcinoma polimorfo de bajo grado: Células inmunocompetentes intratumorales

- a) Tumor maligno densamente celular constituido por estructuras cordonales y sólidas entre las que se observa la formación de estructuras pseudoglandulares. Hematoxilina - Eosina.
- b) Las células tumorales se disponen tanto difusamente como separadas por finos tractos fibrosos. Inset: las células tumorales presentan núcleo claro vesiculoso y escaso citoplasma eosinófilo o microvacuolado. Hematoxilina - Eosina.
- c) Patrón glandular pseudopapilar con presencia de linfocitos T CD3+ en el eje conectivo vascular de las papilas. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- d-e) Los linfocitos TCD4+ se disponen en el interior de los epitelios glandulares. Anti- CD4 - Hematoxilina.
- f) Patrón sólido con muy escasos linfocitos T CD8+. Inset: necrosis de una célula tumoral asociada íntimamente a un linfocito CD8+. Anti- CD8 - Hematoxilina.
- g) Formación quística tumoral con múltiples papilas intraluminales y mínima presencia de linfocitos CD20+. Anti- CD20 - Hematoxilina.
- h) Área de adenocarcinoma pobremente diferenciado y linfocito T CD20+. Inset: el marcaje CD20 en el citoplasma de este linfocito es muy intenso y granular. Anti- CD20 - Hematoxilina.
- i) Patrón difuso indiferenciado en donde se evidencian aislados macrófagos CD68+ con intenso inmunomarcaje. Anti- CD68 - Hematoxilina.
- j) Tumor epitelial indiferenciado con múltiples macrófagos inmunomarcados. Anti- CD68 - Hematoxilina.
- k) Excepcionalmente se observa una infiltración difusa de células dendríticas S100+ en el interior de los nódulos tumorales. Anti- S100 - Hematoxilina.

Adenocarcinoma Polimorfo de Bajo Grado

Células inmunocompetentes intratumorales

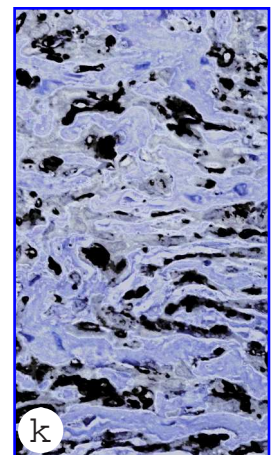
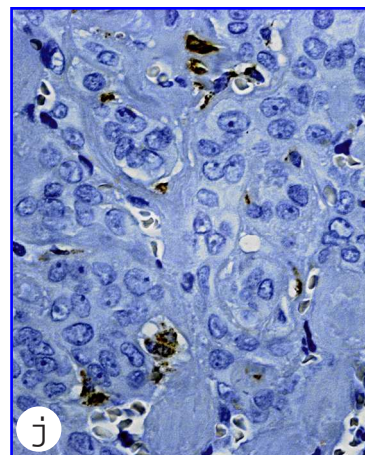
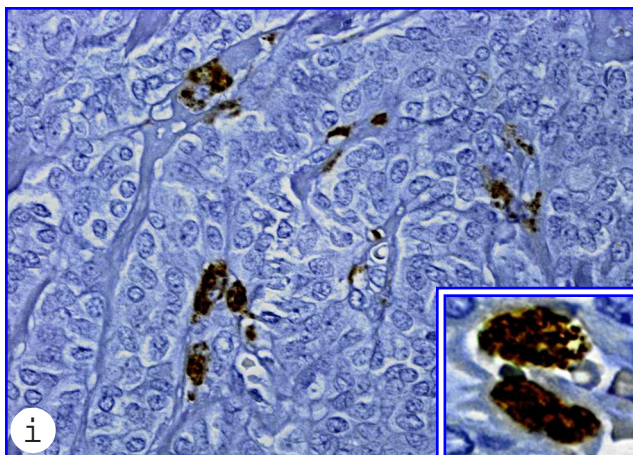
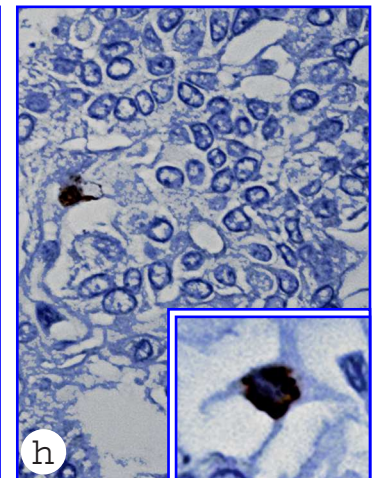
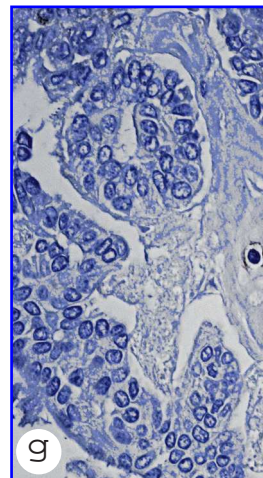
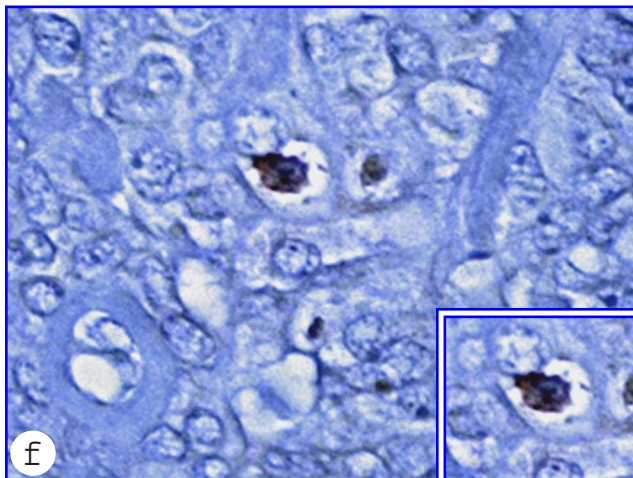
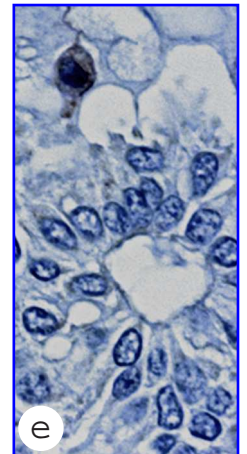
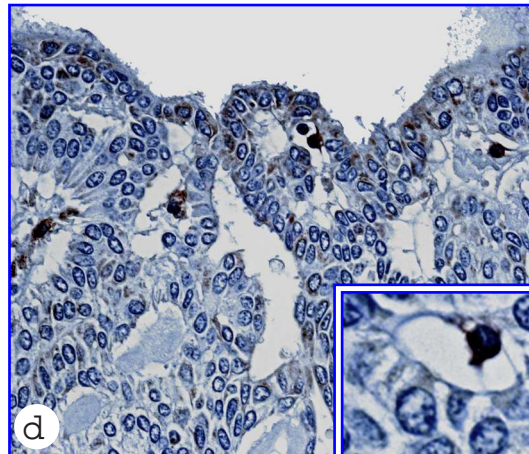
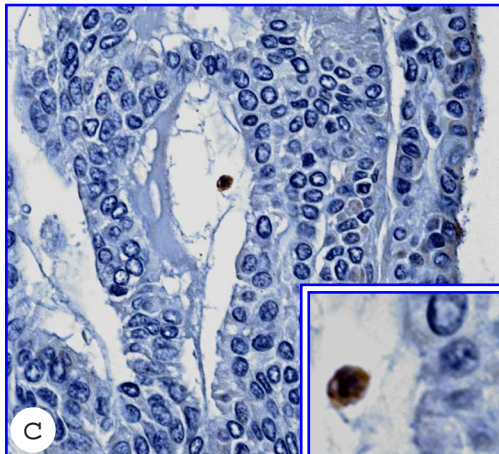
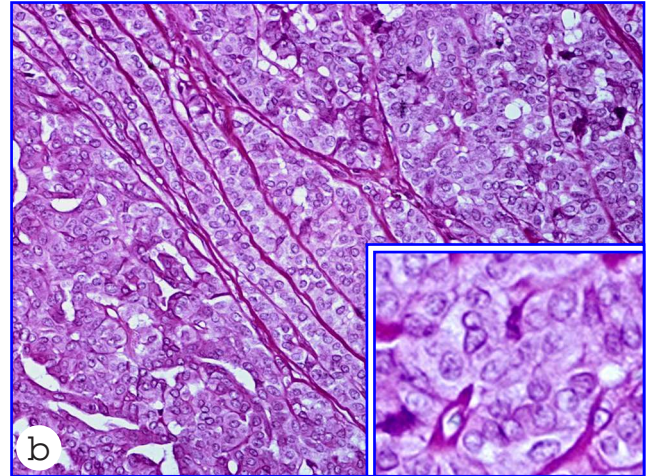
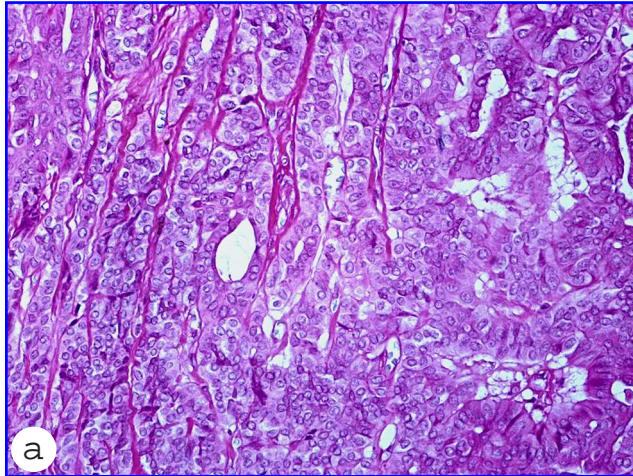
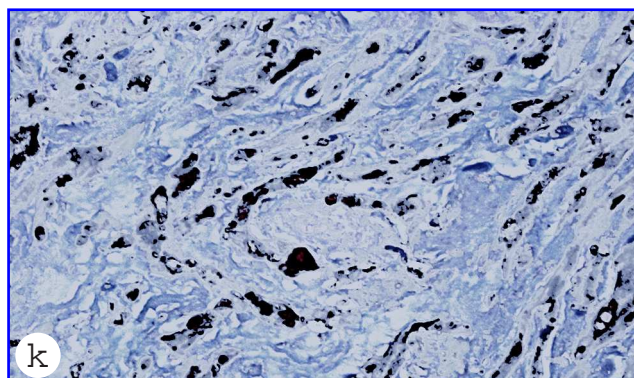
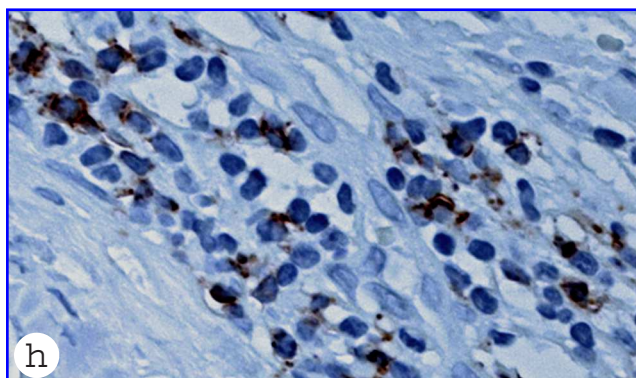
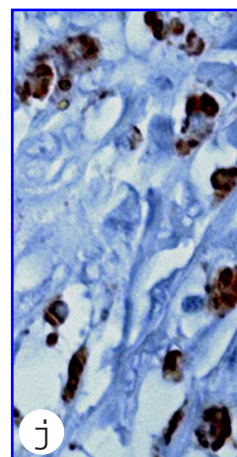
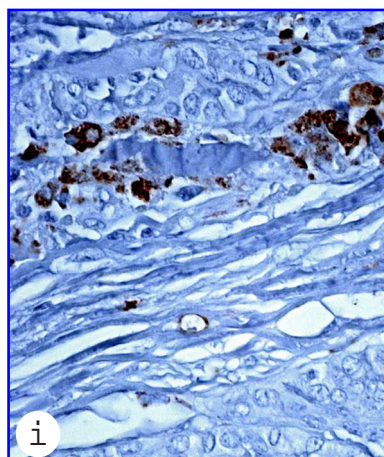
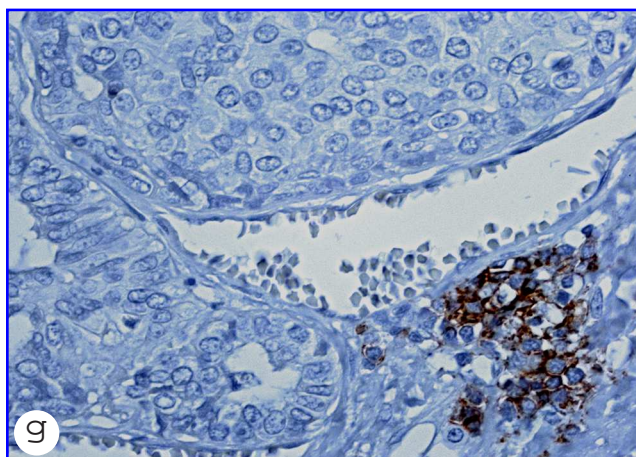
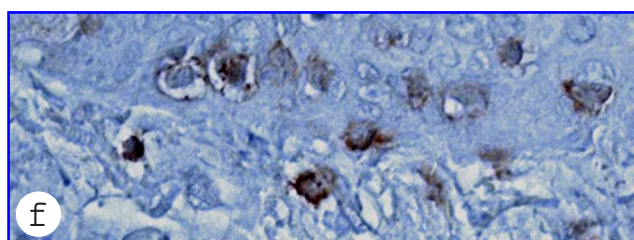
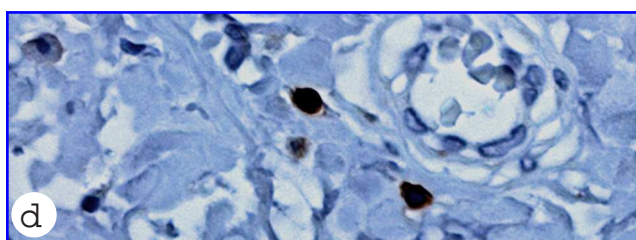
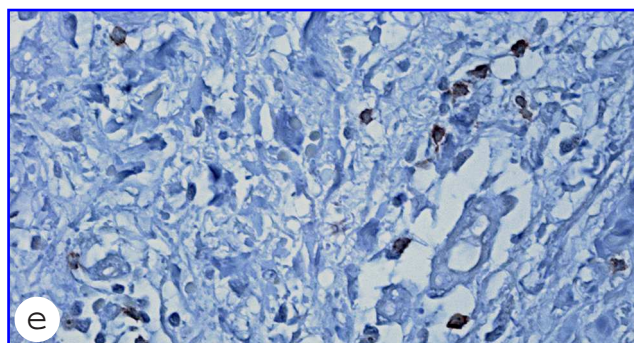
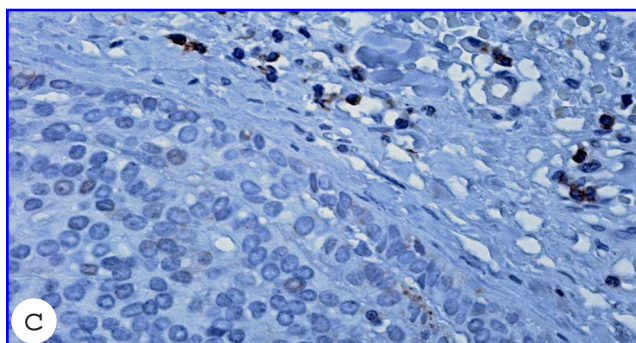
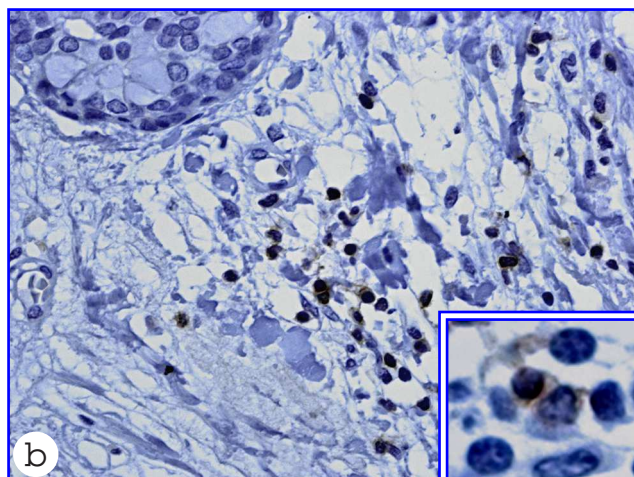
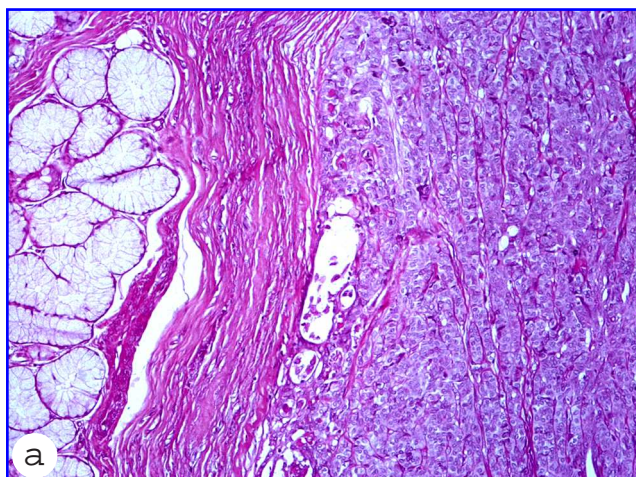


Fig. 22. Carcinoma polimorfo de bajo grado: Células inmunocompetentes en zona de invasión

- a) Interfase entre el tumor y la glándula salivar adyacente. Destaca una gruesa cápsula de tejido conjuntivo. Hematoxilina - Eosina.
- b) Área de edema y necrosis peritumoral con nidos de linfocitos T CD3+. Anti- CD3 - Hematoxilina.
- c-d) En la reacción desmoplásica pseudocapsular que rodea a los nódulos tumorales es evidente la infiltración de linfocitos CD4+ con intenso marcaje en la membrana citoplasmática. Anti- CD4 - Hematoxilina.
- e-f) En la periferia de los nódulos tumorales y en las áreas infiltrantes también existe un número variable de linfocitos CD8+, siendo evidente el típico patrón de membrana de la expresión de este epítipo. Anti- CD8 - Hematoxilina.
- g-h) Los linfocitos B Cd20+ característicamente forman cúmulos en el tejido desmoplásico peritumoral. Anti- CD20 - Hematoxilina.
- i-j) En las áreas de fibrosis y necrosis asociadas a los frentes de invasión tumoral se visualizan macrófagos CD68+. Anti- CD68 - Hematoxilina.
- k) La detección del epítipo S100 permite identificar numerosas células dendríticas en la zona de invasión tumoral. Anti- S100 - Hematoxilina.

Adenocarcinoma Polimorfo de Bajo Grado

Células inmunocompetentes en zona de invasión



**TUMORES MALIGNOS DE ALTO GRADO:
COMPARACIONES DE CADA UNO DE LOS MARCADORES DE CÉLULAS
INMUNOCOMPETENTES ENTRE LA ZONA DE INVASIÓN Y LA MASA PRINCIPAL
INTRATUMORAL**

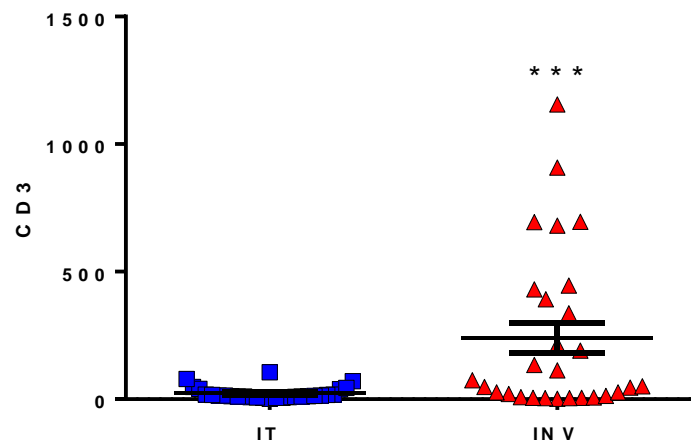


Figura 23. Tumores malignos de alto grado.

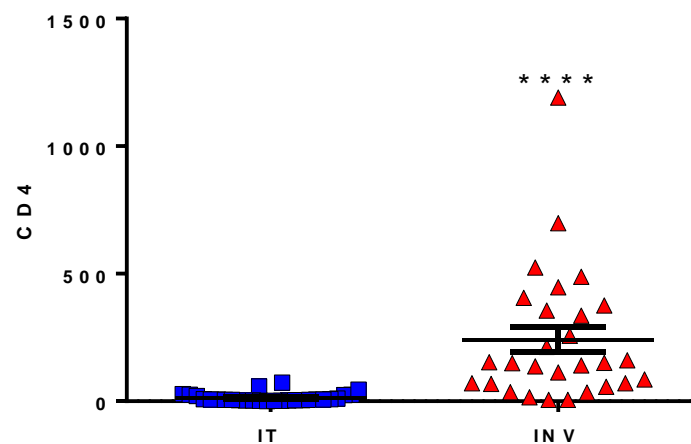


Figura 24. Tumores malignos de alto grado.

*** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

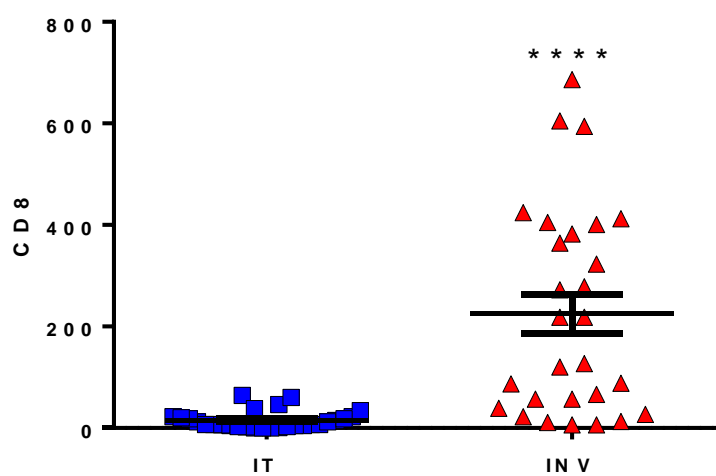


Figura 25. Tumores malignos de alto grado.

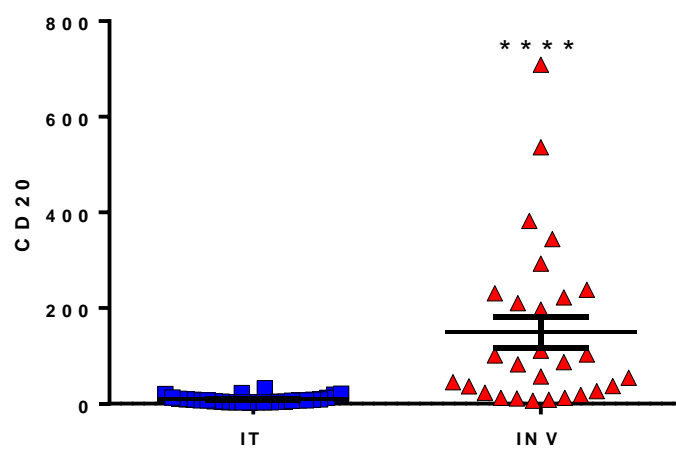


Figura 26. Tumores malignos de alto grado.

**** $p < 0.0001$

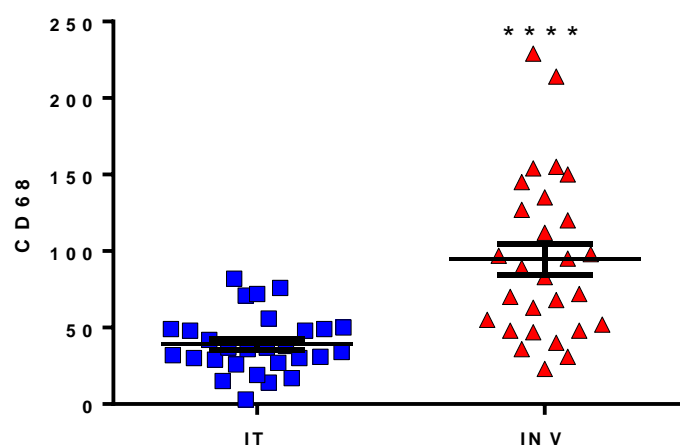


Figura 27. Tumores malignos de alto grado.

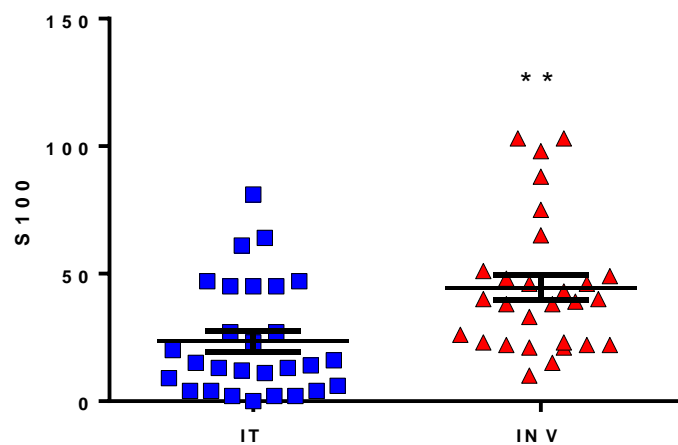


Figura 28. Tumores malignos de alto grado.

** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$

**TUMORES MALIGNOS DE BAJO GRADO:
COMPARACIONES DE CADA UNO DE LOS MARCADORES DE CÉLULAS
INMUNOCOMPETENTES ENTRE LA ZONA DE INVASIÓN Y LA MASA PRINCIPAL
INTRATUMORAL**

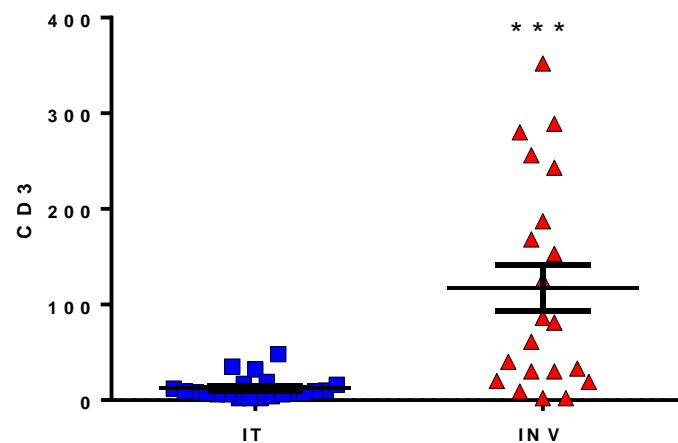


Figura 29. Tumores malignos de bajo grado.

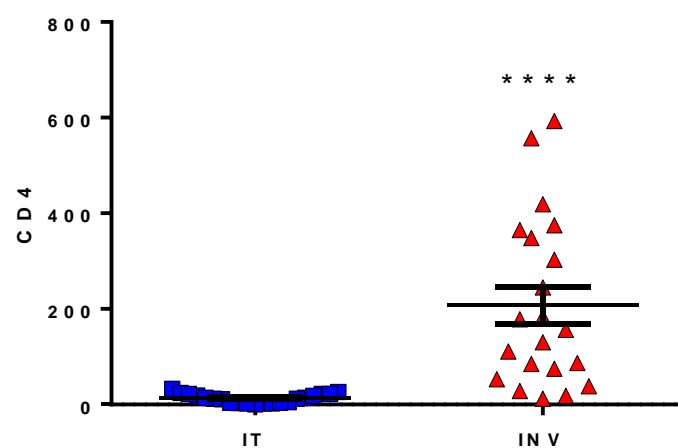


Figura 30. Tumores malignos de bajo grado.

*** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

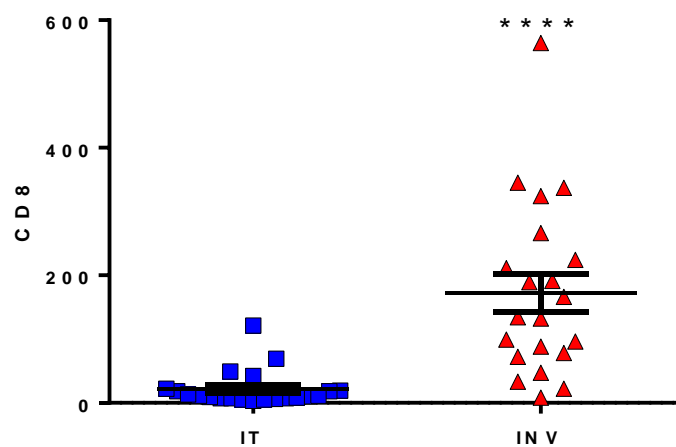


Figura 31. Tumores malignos de bajo grado.

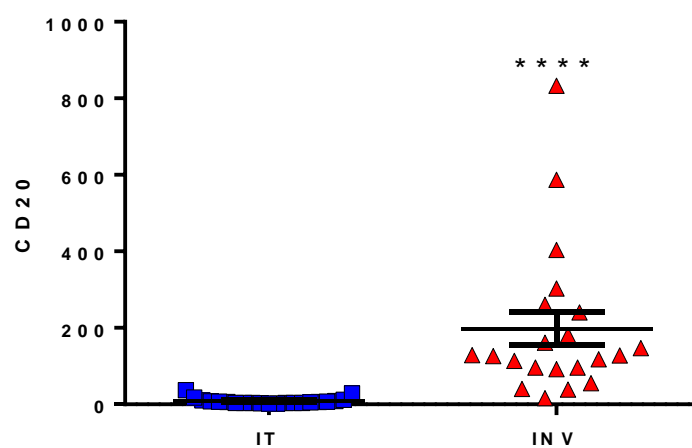


Figura 32. Tumores malignos de bajo grado.

**** $p < 0.0001$

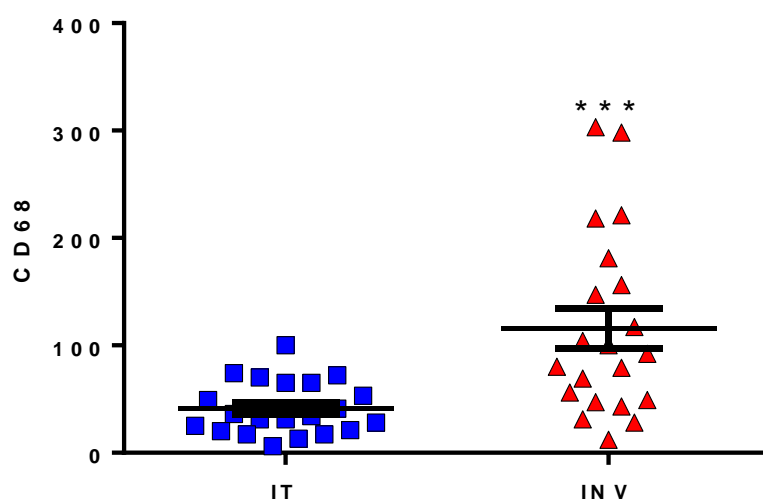


Figura 33. Tumores malignos de bajo grado.

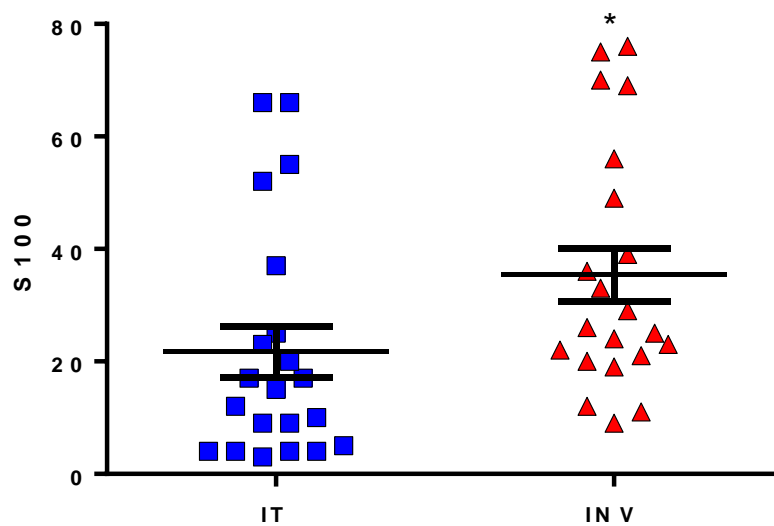


Figura 34. Tumores malignos de bajo grado.

* p < 0.05; *** p < 0.001

COMPARACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA CADA UNO LOS MARCADORES DE CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES EN LAS ZONAS DE INVASIÓN TUMORAL ENTRE LOS GRUPOS DE BAJO GRADO Y ALTO GRADO DE TUMORES SALIVARES MALIGNOS.

Tabla 14. Cuantificación de células inmunocompetentes en las zonas invasivas en los tumores de Bajo Grado y Alto Grado (Media \pm SEM).

Marcador	Bajo Grado (n=21)	Alto Grado (n=28)
CD3	117.40 \pm 24.21	240.30 \pm 60.29
CD4	207.60 \pm 38.55	240.80 \pm 49.10
CD8	172.70 \pm 29.76	225.30 \pm 38.69
CD20	198.30 \pm 43.15	149.70 \pm 32.84
CD68	115.80 \pm 18.65	94.86 \pm 10.11
S100	35.43 \pm 4.74	44.57 \pm 5.05

La comparación de las células inmunocompetentes positivas, con los diferentes marcadores estudiados, en las zonas de invasión tumoral no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas entre los tumores de bajo grado y alto grado (Figs. 35-40).

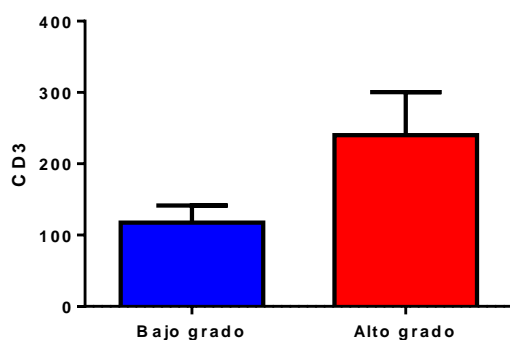


Figura 35. Comparación de la expresión de CD3 en las zonas de invasión entre los tumores de bajo y alto grado.

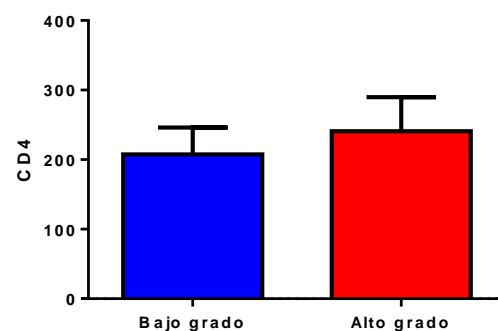


Figura 36. Comparación de la expresión de CD4 en las zonas de invasión entre los tumores de bajo y alto grado.

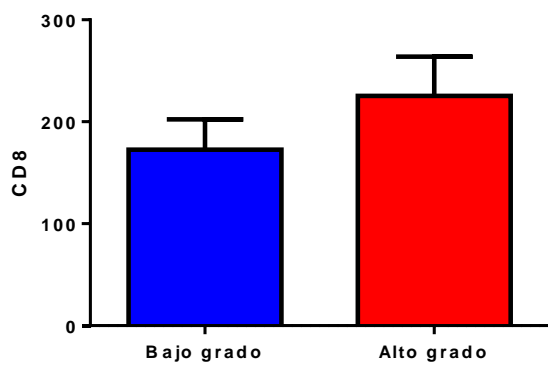


Figura 37. Comparación de la expresión de CD8 en las zonas de invasión entre los tumores de bajo y alto grado.

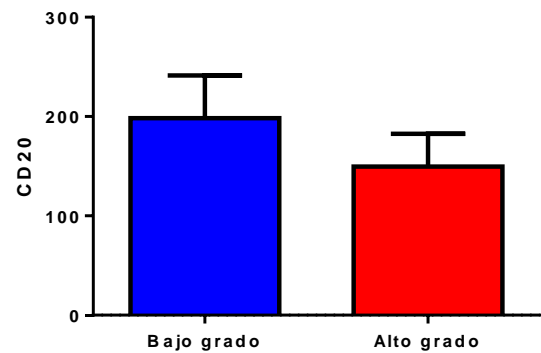


Figura 38. Comparación de la expresión de CD20 en las zonas de invasión entre los tumores de bajo y alto grado.

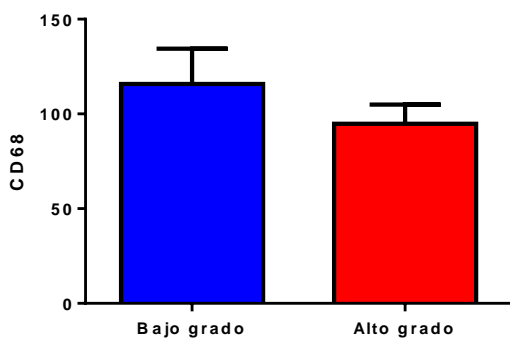


Figura 39. Comparación de la expresión de CD68 en las zonas de invasión entre los tumores de bajo y alto grado.

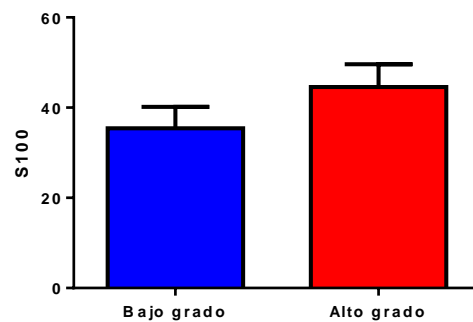


Figura 40. Comparación de la expresión de S100 en las zonas de invasión entre los tumores de bajo y alto grado.

ESTUDIO DE CORRELACIÓN

En la tabla 11 se resume el estudio de correlación tanto entre la expresión de los diferentes marcadores en una misma zona (masa tumoral principal o zona de invasión), como entre las distintas zonas (Figs. 35-60). Con la letra **A** se expresan las correlaciones estadísticamente significativas encontradas en los **Tumores de Alto Grado** y con la letra **B** las de los **Tumores de Bajo Grado**.

Tabla 15. Resumen del estudio de correlación

[illegible]

Estudio de Correlación en los Tumores Malignos de Alto Grado para cada uno de los Marcadores de Células Inmunocompetentes

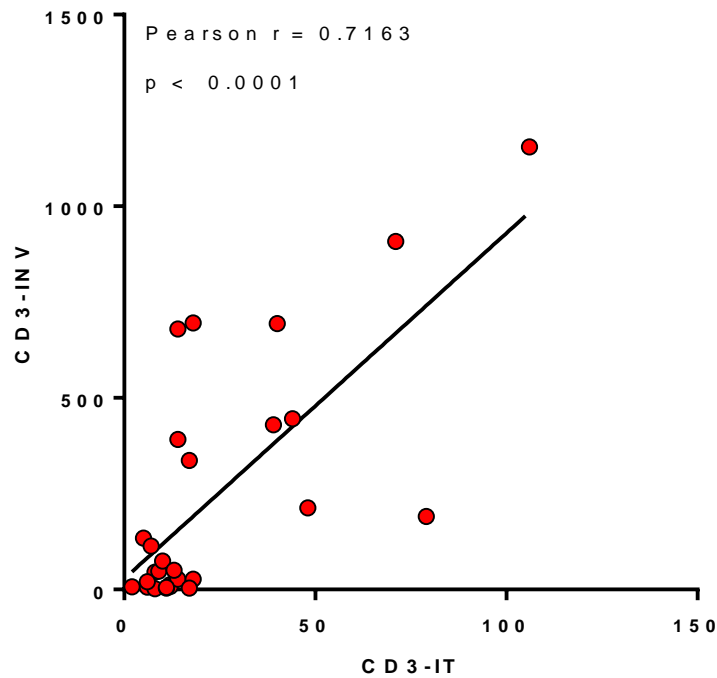


Figura 41. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

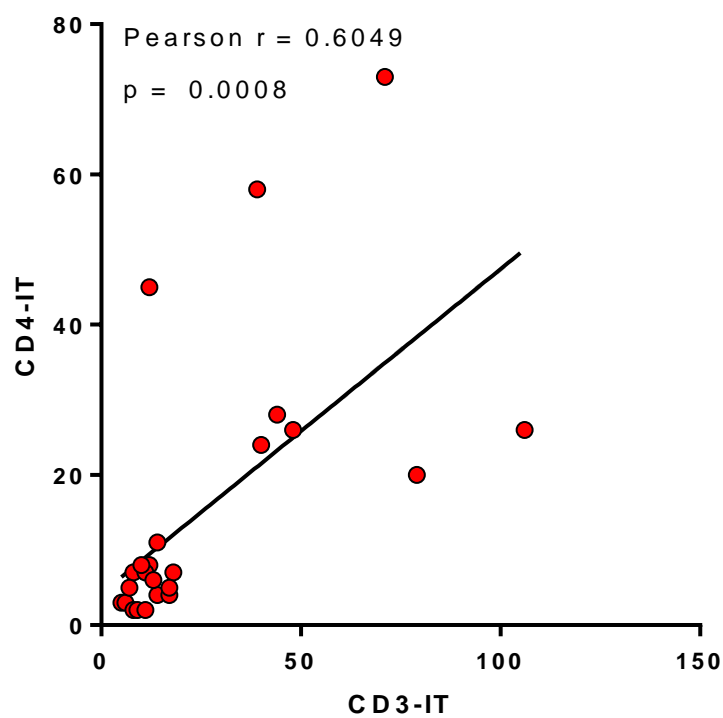


Figura 42. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

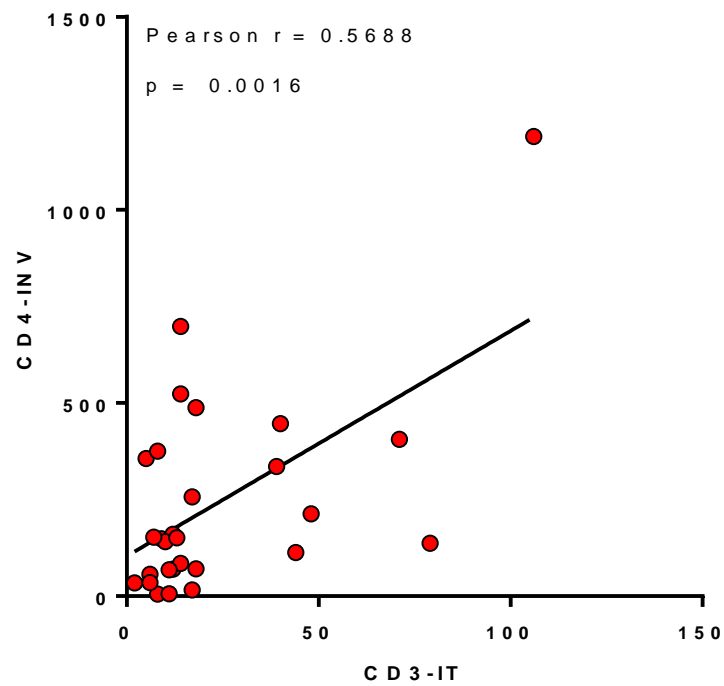


Figura 43. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

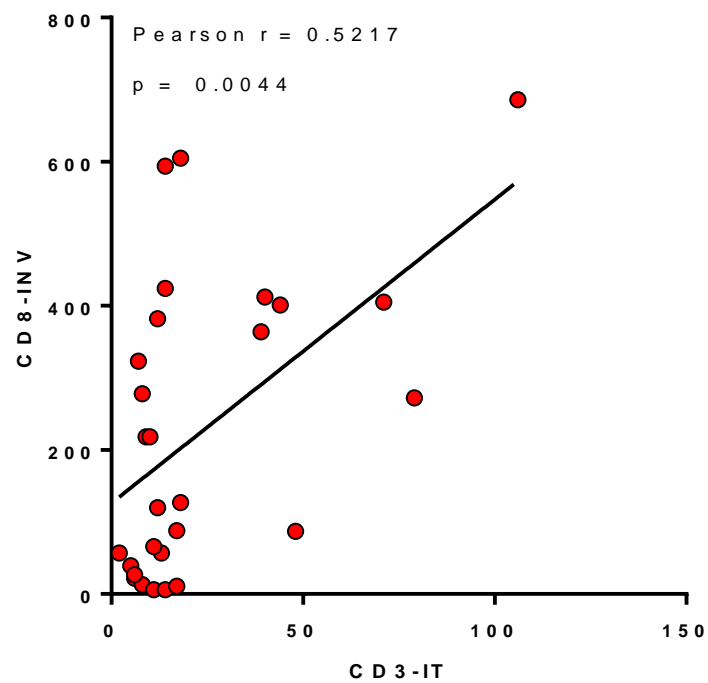


Figura 44. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

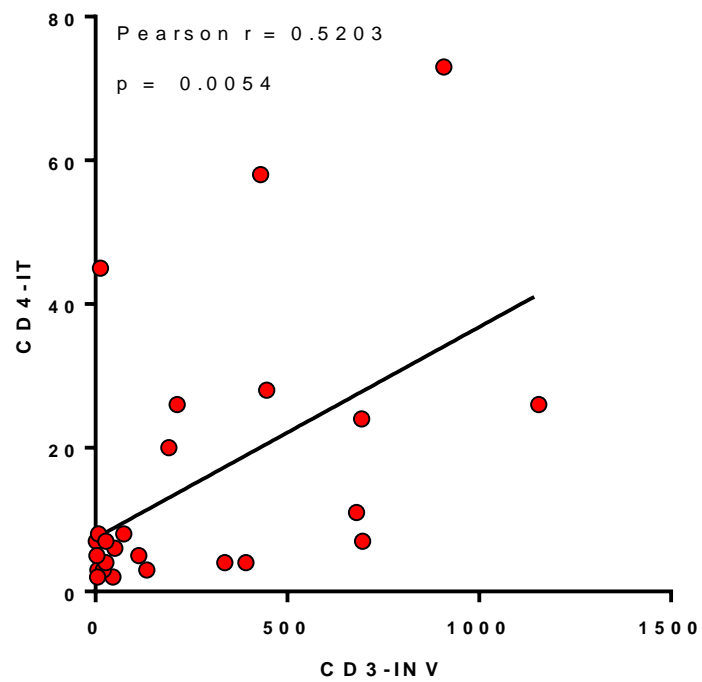


Figura 45. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

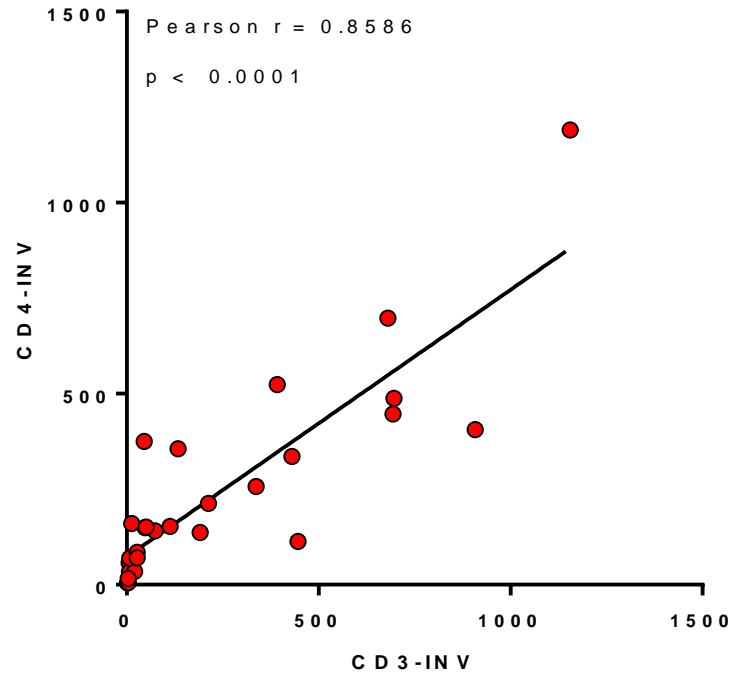


Figura 46. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

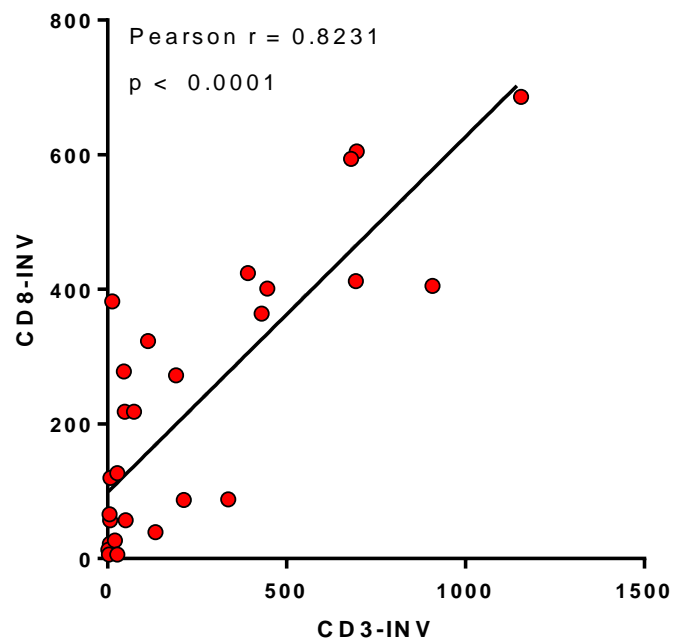


Figura 47. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

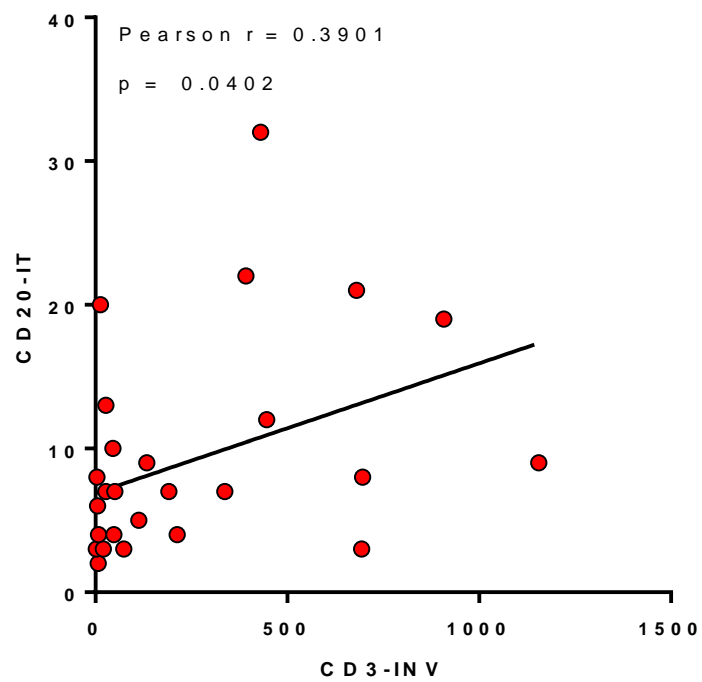


Figura 48. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

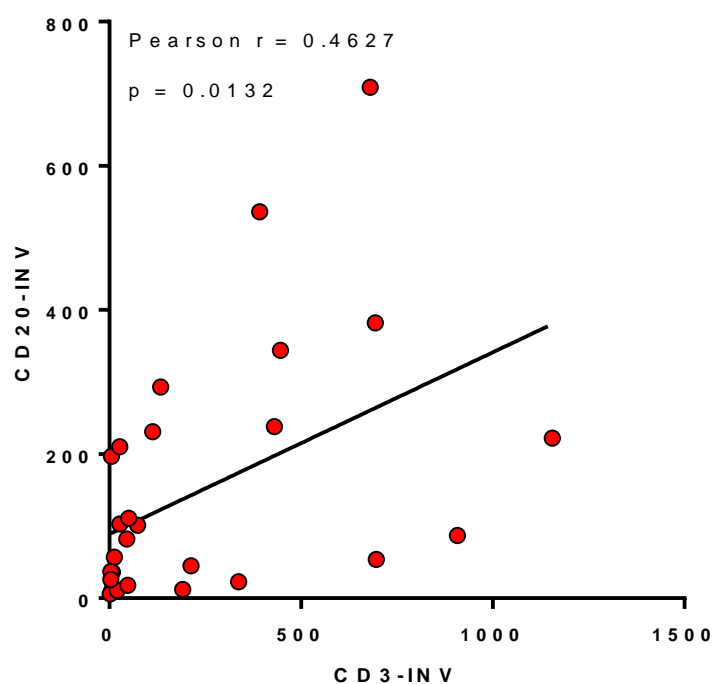


Figura 49. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

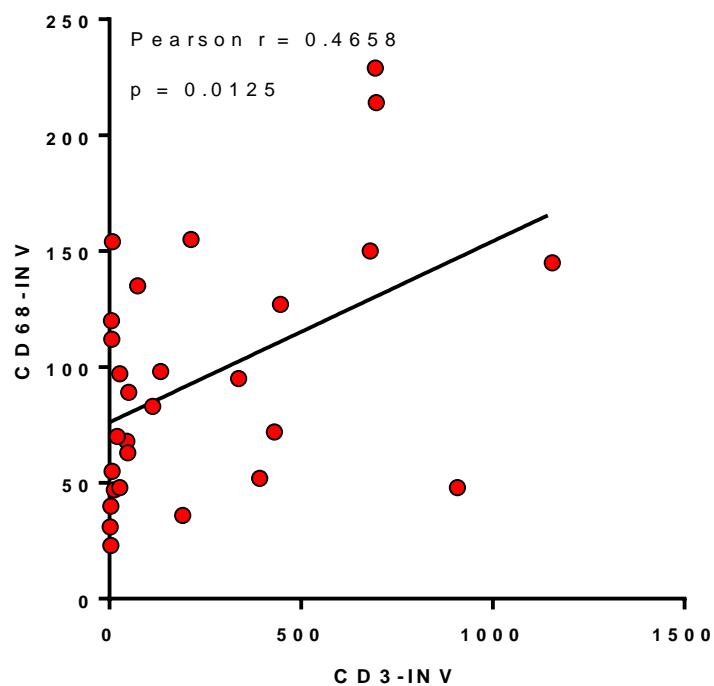


Figura 50. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

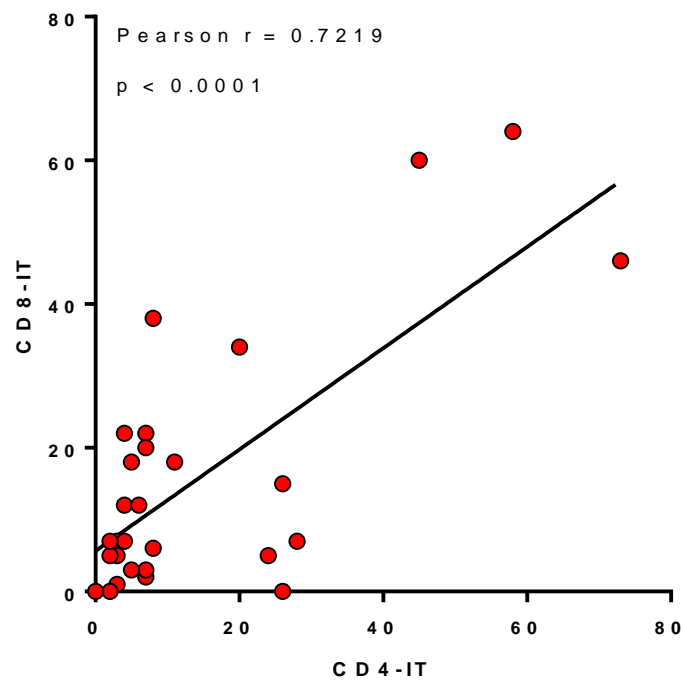


Figura 51. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

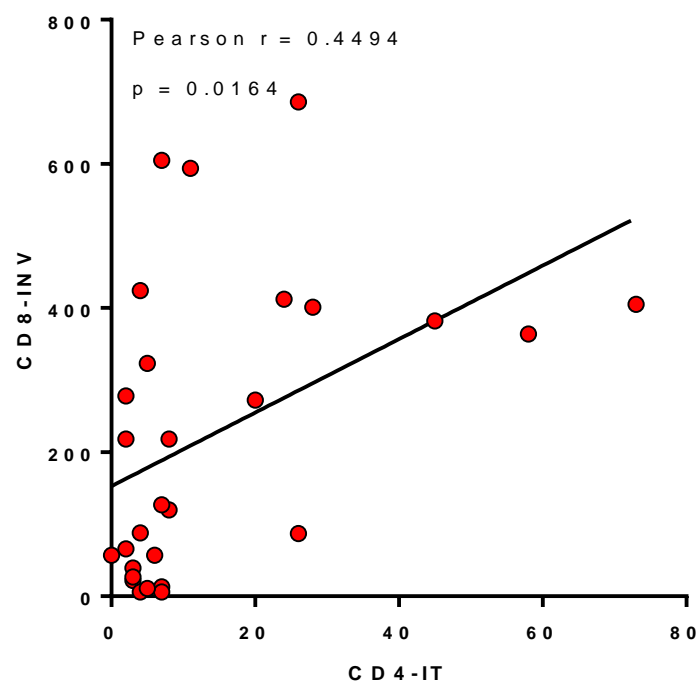


Figura 52. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

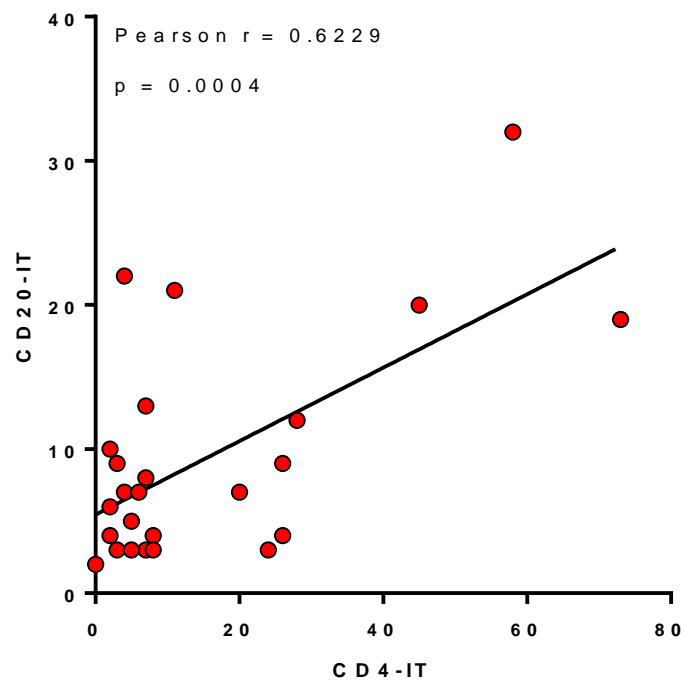


Figura 53. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

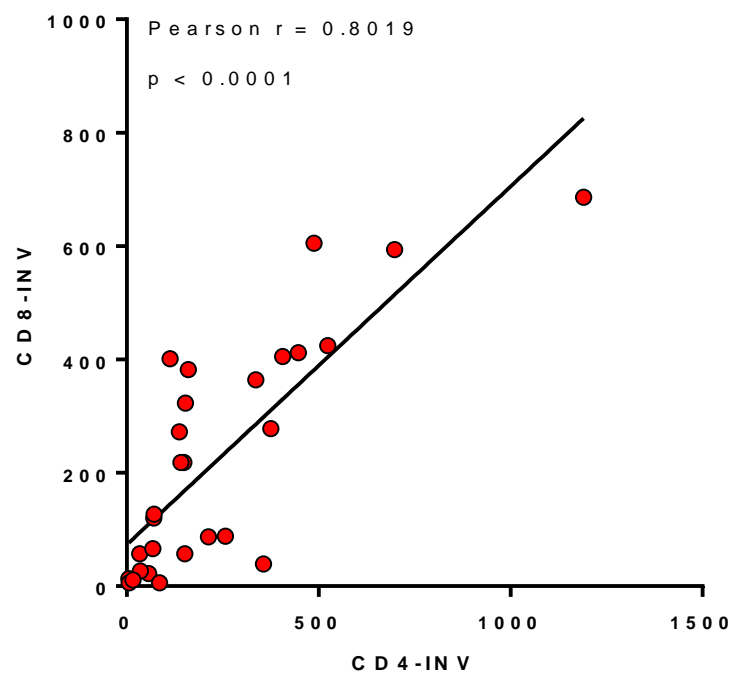


Figura 54. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

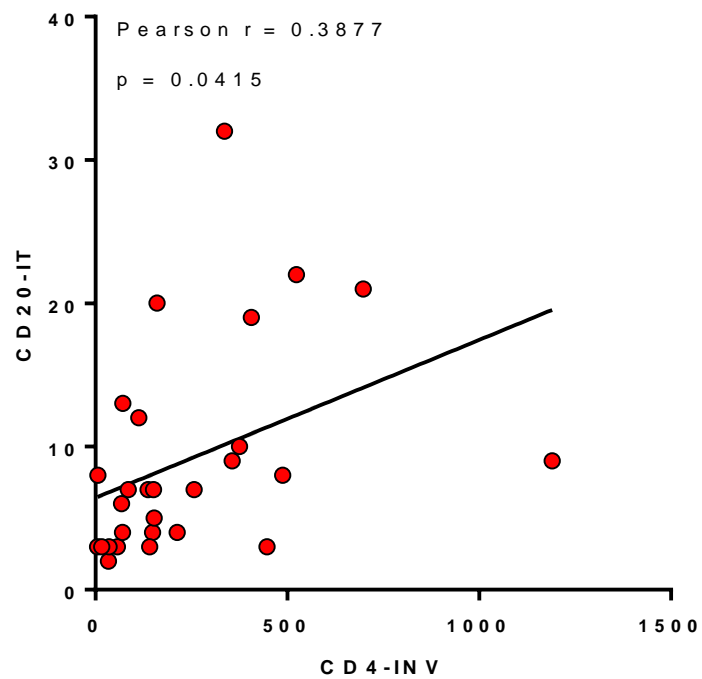


Figura 55. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

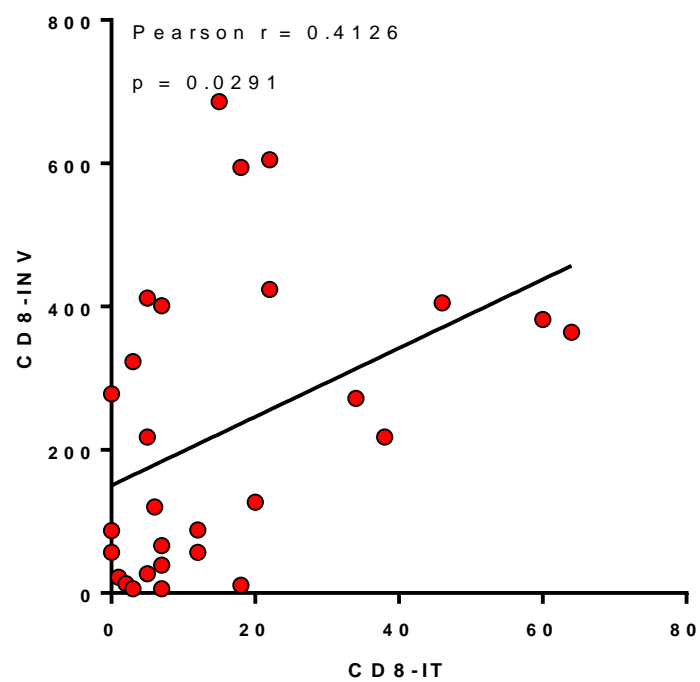


Figura 56. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

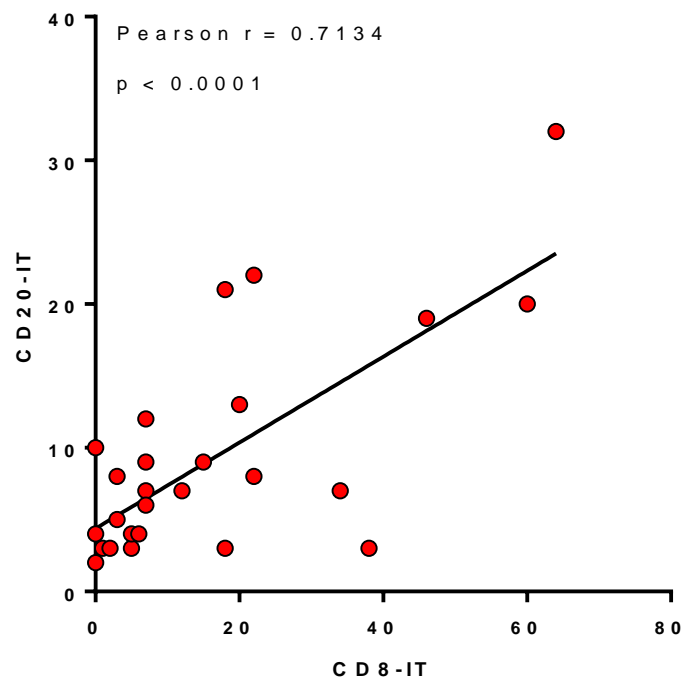


Figura 57. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

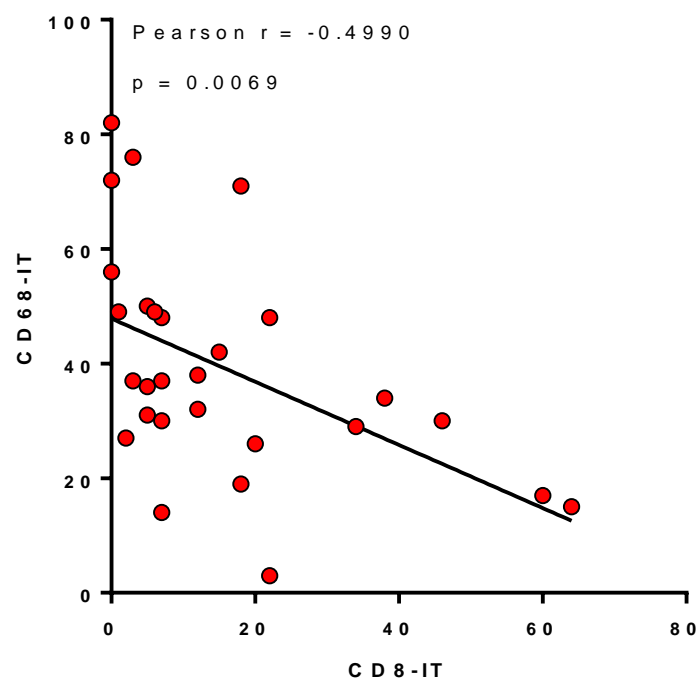


Figura 58. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

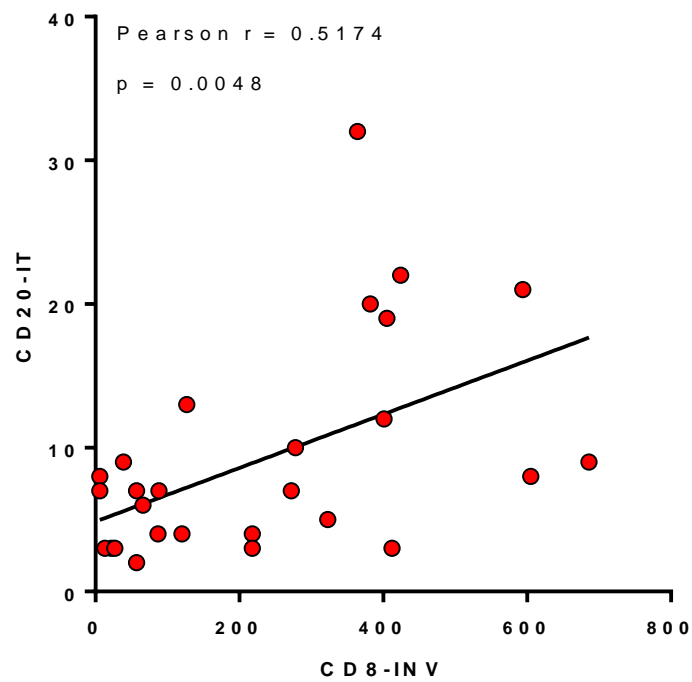


Figura 59. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

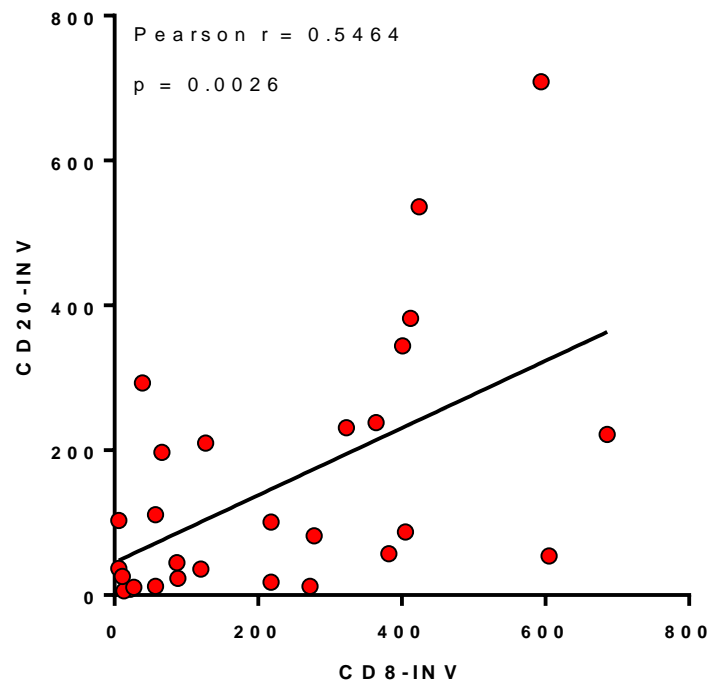


Figura 60. Grupo II: Tumores malignos de alto grado.

Estudio de Correlación en los Tumores Malignos de Bajo Grado para cada uno de los Marcadores de Células Inmunocompetentes

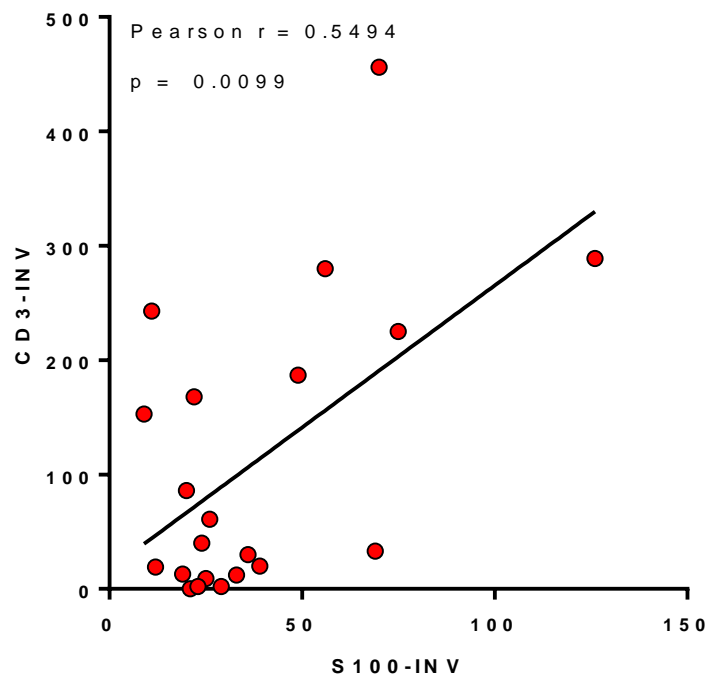


Figura 61. Grupo I: Tumores malignos de bajo grado.

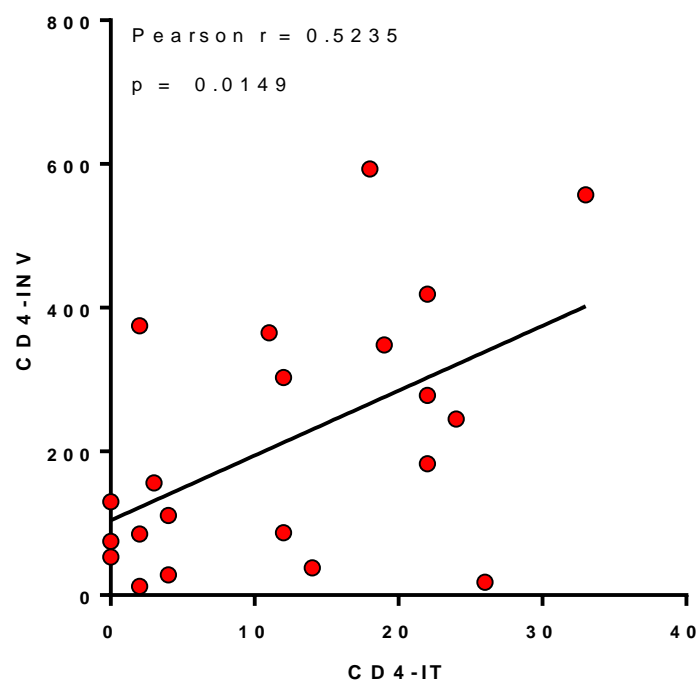


Figura 62. Grupo I: Tumores malignos de bajo grado.

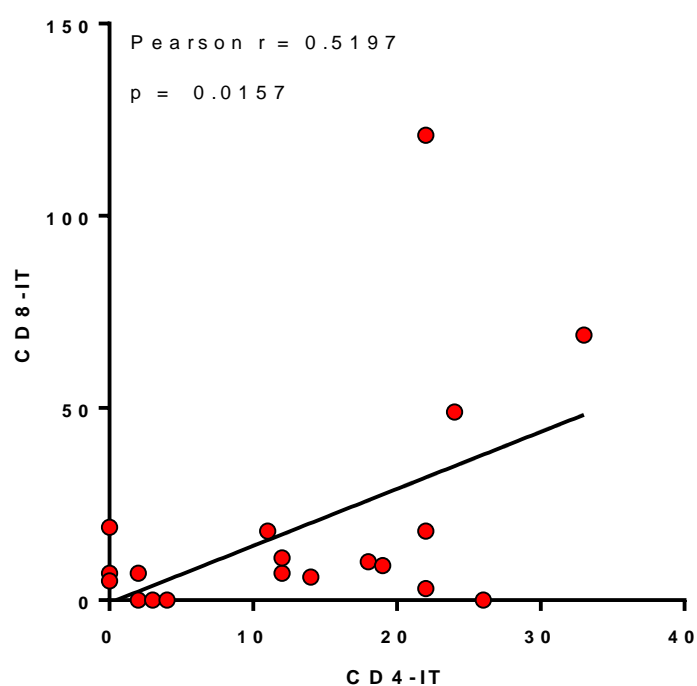


Figura 63. Grupo I: Tumores malignos de bajo grado.

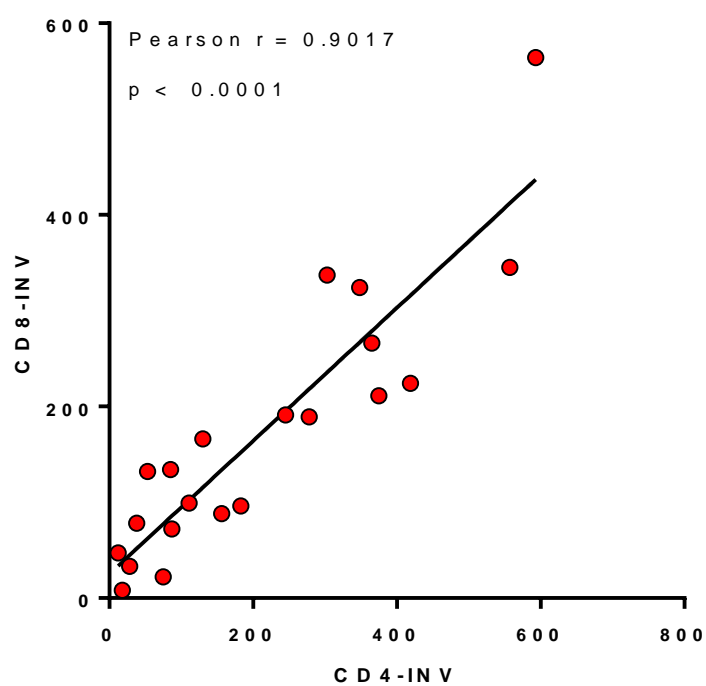


Figura 64. Grupo I: Tumores malignos de bajo grado.

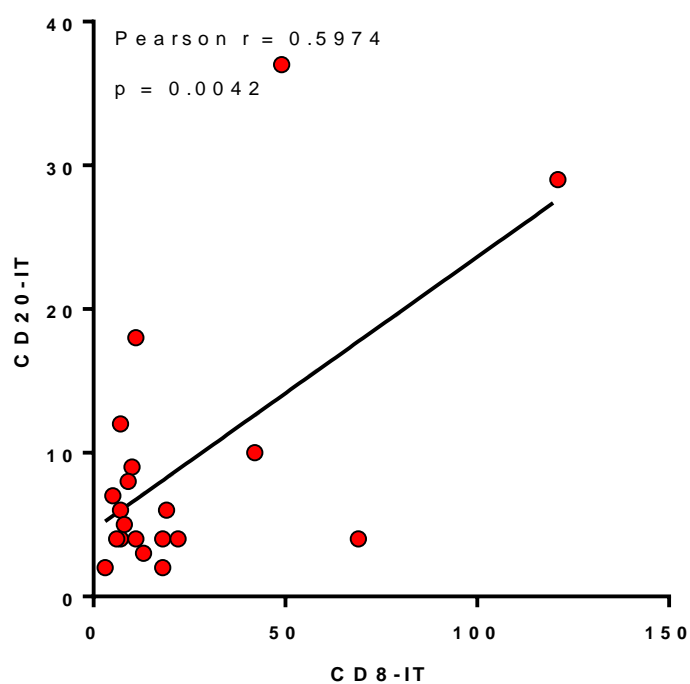


Figura 65. Grupo I: Tumores malignos de bajo grado.

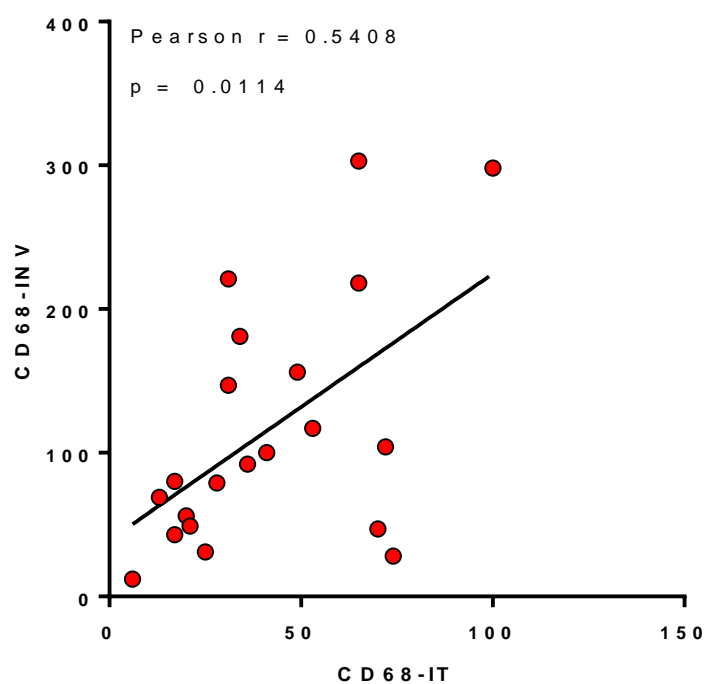


Figura 66. Grupo I: Tumores malignos de bajo grado.

DISCUSIÓN

Los infiltrados linfoides son frecuentes en las enfermedades inflamatorias de las glándulas salivares, incluidas las sialoadenitis aguda y crónica y en las sialolitiasis; además, acumulos de células inflamatorias muy extensos y que destruyen gran parte del parénquima glandular salivar se ven en enfermedades auto-inmunes, en pseudolinfomas y en linfomas.^{6,34,61,67} El perfil de células inmunocompetentes en glándulas salivares se ha peecisado en particular con el síndrome de Sjögren,^{65,135,158} existiendo una amplia evidencia de publicaiones.^{8,27,80,90,115,139,144} Por el contrario, en nuestro conocimiento y en relación con la presencia de células inmunocompetentes en tumores benignos y malignos de las glándulas salivales solo se ha publicado el trabajo de Karja *et al.*, 1995,⁷² estudio centrado en la evaluación de los linfocitos B asociados al tumor, estos autores presentaron una serie de 216 tumores salivares, en la que evaluaron los linfocitos B mediante la identificación de IgA, IgG, IgM y también evaluaron el total de células T

Los tumores salivares son relativamente poco frecuentes, con una incidencia global de 2.5 a 3 por 100.000 al año. Más del 90% corresponden a neoplasias epiteliales, les corresponde menos del 2% de los tumores en el ser humano.^{89,137} La incidencia anual de los tumores de glándulas salivares, teniendo en cuenta diferentes series, varía de 0.4 a 6.5 casos por 100000 habitantes.⁴² En México, de acuerdo al registro histopatológico de neoplasias, que es una fuente fiable de cifras ya que recoge los reportes de patología de todo México, se reporta una incidencia de tumores de glándulas salivares de 0.30 entre todos los tumores malignos.

En un estudio realizado en el Hospital Universitario de la ciudad de Monterrey, N.L., basado en los informes anatomopatológicos, se revisaron los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario del 1 de enero de 1984 al 30 de septiembre de 2013 en busca de tumores de glándulas salivares en población adulta y pediátrica. En este período de 30 años se diagnosticaron 230 tumores de glándulas salivares mayores y menores, siendo 97 casos tumores benignos (47.8%) y 106 neoplasias malignas (52.2%); de esta serie, el tumor más frecuente fue el adenoma pleomórfico (38%), seguido en frecuencia por el carcinoma mucoepidermoide (14.8%). La parótida fue la glándula en la que más tumores salivares (incluidos los benignos y malignos) se desarrollaron (70.9%), siguiendo en

frecuencia la submaxilar (16.3%) y las glándulas salivares menores (12.8%). En el caso particular de los tumores malignos, la parótida sigue siendo la glándula más afectada (60%), seguida por las glándulas salivares menores (23%) y, en tercer lugar, las submaxilares (17%).

En la presente serie Los tumores benignos son más frecuentes en las mujeres (67%) y a una edad más temprana, y los malignos son ligeramente más frecuentes en los hombres (52%) y a una edad más tardía. El pico de mayor incidencia se presentó en la 6ª década de la vida, con 50% de casos de tumores benignos y 50% de malignos, pero a partir de los 60 años predominan los malignos. La media de edad de presentación de los tumores malignos fue de 52 años y, la de los tumores benignos, 43 años. Estas cifras son similares a la mayoría de las series reportadas en la literatura,^{42,120} con algunas diferencias, como una mayor incidencia de tumores malignos (52.2%); de otra parte, no tenemos casos en glándulas sublinguales. El promedio de edad para los tumores malignos fue de 52.5 años, muy cercano a lo descrito en la literatura (53.15 años). El promedio de edad para los tumores benignos fue de 43.2 años.

En cuanto a la distribución por tipos de tumor y tumores por glándula, nuestros datos concuerdan con los ya publicados, siendo el adenoma pleomórfico y el carcinoma mucoepidermoide los más frecuentes.

De la revisión completa de la literatura acerca de los diferentes mecanismos que intervienen en la génesis y progresión de los tumores de glándulas salivares no hemos encontrado estudios centrados en la descripción del perfil de células inmunocompetentes presentes en estos tumores. Pro ello el objetivo principal del presente estudio es valorar cuantitativamente la presencia de cada tipo de células linfoides asociadas a tumores y validar la hipótesis de la participan de estas células inmunocompetentes en las áreas de invasión tumoral, correlacionando los datos cuantitativos del inmunofenotipo con una mayor agresividad tumoral. Estos estudios son completamente inéditos en los tumores de glándulas salivares y, de otra parte han sido totalmente validados en numeroso tumores malignos (carcinoma de mama,^{3,10,23,33,38,145} tumores germinales testiculares,¹⁴¹ melanomas y sarcomas).^{10,145} En concreto, en el presente estudio hemos investigado el perfil inmunohistoquímico de células inmunocompetentes en 49 tumores de glándulas salivares y en 4 glándulas parótidas normales.

La presencia de linfocitos y macrófagos en el intersticio de las glándulas salivares normales es muy escaso, existiendo numerosos lobulillos que carecen de células inmunocompetentes. En las glándulas parótidas normales estudiadas (grupo control) encontramos linfocitos T CD3+ y CD4+ intraglandulares, entre los acinos serosos, y en menor cantidad linfocitos T CD8+ y escasos linfocitos B CD20+. En los ganglios linfáticos situados en la región parotídea encontramos abundantes linfocitos B CD20+, así como macrófagos CD68+ en los sinusoides; estas células son excepcionalmente visibles en el tejido glandular salivar. Las células dendríticas S100+ se observaron tanto en el tejido glandular parotídeo como en los ganglios linfáticos intraparotídeos. Se sabe que las células dendríticas son constituyentes comunes de las glándulas salivares normales y se encuentran en el epitelio de los acinos y los conductos.⁸¹

Estudios de investigación básica han demostrado que el sistema inmune de las glándulas salivares comprende dos elementos clásicos del sistema inmune asociado a mucosas: uno es el componente secretor, una glicoproteína receptora para la IgA dimérica y para la pentamérica IgM, y que es producido por las células epiteliales en los acinos, ductos intercalados y ductos estriados. El otro elemento es el tejido linfoide intersticial, el cual se distribuye de manera difusa en la glándula, en el tejido conectivo cercano a los acinos y conductos o se organiza en ganglios linfáticos.⁹⁶

El inmunofenotipo de los infiltrados linfoides asociados a los tumores malignos de glándulas salivares se realizó en 49 casos en los que se pudo acceder a las laminillas, bloques de parafina e informes histopatológicos. El 40.6% (20 casos) fueron diagnosticados de Carcinoma mucoepidermoide, el 18.5% (9 casos) fueron Adenocarcinomas, el 14.5% (7 casos) fueron Carcinomas adenoide quísticos, el 8.1% (4 casos) Carcinomas de células acinares, el 6.1% (3 casos) Carcinomas mioepiteliales, el 6.1% (3 casos) Carcinomas epitelial-mioepitelial y el 6.1% (3 casos) Adenocarcinomas polimorfos de bajo grado. Esta distribución en la incidencia de tumores malignos, es similar a lo reportado en la literatura.⁴²

La presencia de linfocitos intratumorales ha sido motivo de múltiples estudios en tumores malignos de diferentes órganos, ya que avances recientes en inmunología tumoral han revelado que el desarrollo clínico del cáncer ocurre después de que las células

neoplásicas escapan a la vigilancia inmune del huésped. Los tumores malignos sólidos son infiltrados en grado variable por células inmunes (TILs), lo cual sugiere una manifestación de la respuesta inmune del huésped contra las células neoplásicas, aunque el curso clínico más que depender del número total de TILs, parece estar más relacionado con el tipo de células inmunocompetentes, de hecho la acumulación de evidencia sugiere que la infiltración por linfocitos T CD8⁺ está asociada con un mejor pronóstico en varios tipos de cáncer. Esto apoya la noción que el cáncer establecido está asociado con actividad antitumoral menos efectiva.¹⁵⁴

Es más, los linfocitos que infiltran tumores (TILs) son considerados un reflejo de la respuesta inmune del huésped contra los tumores malignos; estos infiltran una variedad de tumores de diversos orígenes histológicos, sin embargo se ha reportado con frecuencia que estos TILs son funcionalmente anérgicos, no obstante, la infiltración tumoral por linfocitos T se ha relacionado con un pronóstico favorable, particularmente en melanoma y carcinomas colorrectales. Por otro lado, la infiltración tumoral por subgrupos de linfocitos T relacionados con funciones inmunoregulatoras o supresivas, como las células T CD4⁺ que expresan el factor de transcripción Foxp3, se ha sugerido que se asocia con progresión tumoral y mal pronóstico. Más recientemente un subgrupo de linfocitos T CD4⁺ que producen IL-17 se han implicado en la patogénesis de diversas enfermedades autoinmunes, pero el significado clínico y molecular de la IL-17 (Th17) en la inmunidad antitumoral permanece en debate.³⁸

Los tumores sólidos son siempre infiltrados por células inmunes cuya composición y extensión varía de un tumor a otro. Se sabe que el microambiente tumoral tiene un gran impacto en las células inmunes y la identidad, fenotipo, localización y densidad de las células inmunes en el tumor es de importancia crítica para la progresión tumoral. La infiltración tumoral por linfocitos T (TIL) se ha utilizado para establecer correlaciones entre la infiltración por células T CD3⁺CD8⁺ y el pronóstico. De acuerdo a una revisión de la literatura, un buen pronóstico se asocia a infiltración por células T CD8⁺ y células B CD20⁺ en el tumor mientras que acumulaciones de Treg y células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) se asocian a una mala evolución.¹⁵⁶ Las células T reguladoras (Treg) tienen un papel esencial en el control de la respuesta inmune contra antígenos propios y extraños. La infiltración tumoral por

células Treg se ha asociado con un pobre pronóstico en algunos tipos de cáncer al suprimir la proliferación de los linfocitos T efectores, lo que evita el desarrollo de una adecuada respuesta inmune específica contra el tumor, favoreciendo el crecimiento tumoral. En contraste otros investigadores han reportado que las células Treg que infiltran tumores se asocian a un mejor pronóstico o no afectan el pronóstico en algunas neoplasias malignas, como linfoma folicular y carcinoma de células escamosas; sin embargo, las características y funciones de las TIL en los carcinomas de cabeza y cuello, incluido el carcinoma nasofaríngeo no se conocen completamente.¹⁶¹

En la presente Tesis se ha demostrado que los tumores malignos salivares desencadena una respuesta inmunológica de tipo celular, la cual está mediada por linfocitos T CD4+ y CD8+, siendo significativamente mucho mayor el número de estos linfocitos T en las áreas infiltrativas del tumor, hecho que se ha evidenciado en todos los tipos histológicos de tumores salivares estudiados. Se sabe que la respuesta inmune en los tumores malignos humanos está representada principalmente por los linfocitos T citotóxicos, generalmente CD8+, las células NK (células asesinas naturales) y diferentes tipos de citocinas.^{5,12,14,94,102,114} Muchos carcinomas y sarcomas expresan antígenos tumorales específicos que inducen una respuesta de las células T citotóxicas específicas. En este sentido, estudios básicos moleculares han señalado que la infiltración tumoral por células T reguladoras inmunosupresivas (Tregs) Foxp3+ se asocian con una reducción en la sobrevida, apoyando su papel en la supresión de la inmunidad antitumoral del huésped, lo cual sugiere que el balance entre las células reguladoras y las células efectoras en el microambiente tumoral es crítico para la sobrevida del paciente.

Brevemente destacamos los hallazgos más significativos del inmunofenotipo de los infiltrados linfoides asociados a cada tipo específico de tumor maligno salivar. Así, en el carcinoma adenoide quístico destaca la presencia de un apreciable número de macrófagos CD68+ y células dendríticas S100+ en el centro de los tumores, notoriamente superior a los infiltrados linfocitarios. Sin embargo, en las zonas de invasión en la periferia del tumor, sorpresivamente se incrementa el inmunomarcaje, de modo que la cantidad de células inmunocompetentes es entre cinco y diez veces superior a las cifras intratumorales, con un

claro predominio de los linfocitos T CD4+ y CD8+. Y este hecho será una constante en todos los tipos histológicos de tumores malignos salivares. De hecho, en los casos de carcinoma de células acinares, las zonas de invasión tienen el doble o triple del número de células inmunocompetentes en comparación con las zonas intratumorales, aunque estas diferencias no son significativas para los diferentes marcadores de linfocitos T.

Los Linfocitos B CD20+ y los macrófagos y las células dendrítica S100+ son, asimismo, significativamente mucho más abundantes en las zonas infiltrativas y desmoplásicas del tumor. En los adenocarcinomas ductales también destaca un significativo mayor número de macrófagos que de linfocitos en las zonas intratumorales. El número de células dendríticas similar a los linfocitos es bajo y muy inferior a los macrófagos. En las zonas de invasión, el número de linfocitos T CD4+ y CD8+ es significativamente mayor que en las zonas intratumorales, así como de linfocitos B CD20+ y macrófagos CD68+ y en estas áreas infiltrantes también se ve una cantidad relevante de células dendríticas S100+.

Caso particular representa el grupo de carcinoma mucoepidermoide ya que pueden ser tumores de bajo grado y muy buen comportamiento biológico tras la estimación, o tumores de grado moderado o de alto grado, en los que las recidivas y la capacidad infiltrante y metastatizante son mayores. En la presente serie, los carcinomas mucoepidermoides de alto grado mostraron una infiltración de células inmunocompetentes intratumorales sin predominio significativo para un determinado marcador, excepto por una mayor proporción de macrófagos ($p < 0.05$), mientras que, en los de bajo grado, la infiltración por linfocitos y macrófagos intratumorales no mostró diferencias significativas. En las zonas de invasión destaca una infiltración mucho mayor por células inmunocompetentes que en las zonas intratumorales, con un número significativamente alto de linfocitos y de macrófagos, siendo significativamente mayor el número de linfocitos T que de linfocitos B. En los carcinomas de bajo grado, el número de células inmunocompetentes en las zonas de invasión es notoriamente inferior comparado con los de alto grado y sin diferencias significativas entre los diferentes tipos de células inmunocompetentes.

Cuando consideramos en su conjunto todos los tumores malignos salivares de bajo grado, también se evidencian infiltrados linfoides asociados al tumor (TIL). En los casos de

carcinoma epitelial mioepitelial, los nódulos tumorales tienen un mayor número de macrófagos que de otras células inmunocompetentes, pero estos datos son poco relevantes dado el número bajo de células inmunomarcadas. En las zonas de invasión, tal como se ha reflejado en las diferentes variedades de tumores revisados, asimismo en estos carcinomas de tipo epitelial-mioepitelial, también el número de linfocitos T CD4+ y CD8+ es significativamente mayor, igual que de linfocitos B. En cuanto a la cantidad de macrófagos y de células dendríticas, no existen diferencias significativas entre la localización intratumoral y en la zona de invasión.

En todas las series de cáncer salivar, los adenocarcinomas polimorfos son una neoplasia muy poco frecuente; por ello el número bajo de casos que hemos tenido la oportunidad de evaluar nos exige ser cautos con la interpretación de los distintos tipos de células inmunocompetentes cuantificados; con todo, existe un significativo número de macrófagos CD68+ mayor que de linfocitos ($p < 0.05$) que se disponen entre las células tumorales malignas; además destaca también un mayor número de células inmunocompetentes en las zonas de invasión del tumor, con un número similar de linfocitos T y B, así como un número mayor, aunque no significativo, de macrófagos CD68+.

En definitiva, en las zonas de invasión predominan los linfocitos T CD4+ y CD8+ en los casos de carcinoma adenoide quístico, adenocarcinoma ductal, carcinomas mucoepidermoides de alto grado y carcinomas mioepiteliales. La acumulación de evidencia publicada en la literatura apoya la idea de que la infiltración por linfocitos T CD8+ está asociada con un mejor pronóstico en varios tipos de cáncer (carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma endometrial, ovárico, pancreático y colorrectal), y en análisis multivariado en pacientes con una alta expresión inmunohistoquímica de CD3 y CD8 se encontró un incremento significativo en la supervivencia promedio.^{11,36,140,154,156,161}

Cuando revisamos de un modo particular el grupo de los tumores malignos de alto grado (n=28) de las glándulas salivares con los diferentes marcadores y comparamos cuantitativamente el número de células marcadas con cada anticuerpo, tanto en las zonas de infiltración como en las áreas intratumorales de los nódulos principales, observamos que los linfocitos CD3+, CD4+, CD8+ y CD20+ predominan en la zona de invasión tumoral, y los

macrófagos CD68+ y las células dendríticas S100+ muestran una amplia distribución intratumoral, aunque también se distribuyen en la zona de invasión. Datos similares hemos obtenido en la valoración cuantitativa de los TILs, en los tumores malignos de bajo grado (n=21), que muestran una distribución muy similar de las diferentes células inmunomarcadas.

Actualmente se ha demostrado que la relación de células T citotóxicas CD8+ y células T reguladoras inmunosupresoras (tregs) Foxp3+ son un factor pronóstico en cáncer de cérvix, ovárico y hepatocelular. Las células T reguladoras supresoras (tregs) que infiltran tumores pueden ser funcionalmente heterogéneas, por ejemplo, en el microambiente tumoral del cáncer de cabeza y cuello se ha demostrado que la supresión inmune se encuentra mediada principalmente por un subtipo de tregs que produce interleucina 10 y factor de crecimiento tumoral (IL-10 y TGF- β). En sangre periférica las células Tregs CCR4+ (pero no las CCR4-) suprimen la proliferación de células T CD8+, lo cual apoya la importancia de estas células en el estudio de los TILs.¹⁵⁴

En el presente estudio se ha intentado establecer si existe cierta tendencia de asociación entre la presencia de los diferentes tipos de células inmunocompetentes en los tumores malignos salivares. En este sentido, mediante la aplicación de test de correlación estadística en los tumores malignos de alto grado hemos encontrado una correlación positiva alta ($r=0.7163$ y $p<0.0001$) entre CD3 en la zona de invasión con CD3 en la zona intratumoral, así como CD4 en zona de invasión con CD3 en zona de invasión ($r=0.8586$ y $p<0.0001$), CD8 en zona de invasión con CD3 en zona de invasión ($r=0.8231$ y $p<0.0001$), CD8 intratumoral con CD4 intratumoral ($r=0.7219$ y $p<0.0001$), CD8 en zona de invasión con CD4 en zona de invasión ($r=0.8019$ y $p<0.0001$), CD20 intratumoral con CD8 intratumoral ($r=0.7134$ y $p<0.0001$).

Estos datos nos permiten sugerir que, en general, los tumores malignos de alto grado presentan una correlación positiva lineal entre los linfocitos T CD4+ y T CD8+ en las zonas de invasión con los linfocitos T CD3+ en las zonas de invasión. De igual forma correlacionan los linfocitos T CD8+ intratumorales y en las zonas de invasión, respectivamnte, con los linfocitos T CD4+ en las zonas intratumoral y de invasión. Cabe destacar, sin embargo, que se

han encontrado correlaciones bajas en los tumores malignos de alto grado cuando se evaluaron comparativamente los linfocitos B CD20+ intratumorales con los linfocitos T CD3+ en zona de invasión ($r=0.3901$ y $p<0.05$), así como de linfocitos B CD20+ intratumorales con linfocitos T CD4+ en zonas de invasión. Por último, en los tumores malignos de bajo grado encontramos una correlación positiva muy alta ($r=0.9017$ y $p<0.0001$) entre los linfocitos T CD8+ en las zonas de invasión con los linfocitos T CD4+ en las zonas de invasión.

En el estudio reciente que aborda el inmunofenotipo de células inmunocompetentes asociadas a tumores malignos ha demostrado una especial relevancia la participación de células presentadoras de antígenos como inmunomoduladores de la respuesta inmunológica desencadenada por las células tumorales, siendo ampliamente evaluados los patrones de infiltración, y su significado funcional, de macrófagos y de células dendríticas S100+ asociadas a los tumores. Sin embargo, en nuestro conocimiento estas células no han sido específicamente evaluadas y tampoco cuantificadas en los diferentes tipos de tumores malignos de glándulas salivares, y asimismo tampoco se ha establecido su particular disposición en aquellos casos de bajo grado y buen comportamiento, o en otros tumores salivares de moderado y de alto grado, cuya evolución es mucho más agresiva.

En nuestra serie, la infiltración por macrófagos CD68+ y por células dendríticas S100+ se destacó más en la localización intratumoral, con respecto a las zonas de invasión, lo cual fue muy evidente en los casos de carcinoma adenoide quístico, carcinomas mioepiteliales, adenocarcinoma polimorfo y en los carcinomas mucoepidermoides de alto grado. Otros tumores mostraron estas células en ambas zonas (intratumoral y de invasión) como los carcinomas ductales y en las zonas de invasión de los carcinomas de células acinares y, en menor medida, en los carcinomas polimorfos de bajo grado. Estudios previos han sugerido que la densidad y maduración de las células dendríticas S100+ asociadas a tumores varía con los diferentes tipos específicos de tumores, éstas se han encontrado en tumores malignos de estómago, colon, hepatocarcinomas, carcinoma de páncreas y vías biliares, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cérvix, melanoma, carcinoma de nasofaringe, carcinoma de laringe y cáncer de tiroides, y aunque los resultados

son controvertidos, en la mayoría de los tumores sólidos existe correlación positiva entre la infiltración por células dendríticas S100+ y un pronóstico favorable.¹²⁷

Las células dendríticas tienen como principal función la presentación de antígenos de las células tumorales a los linfocitos T CD4+ y CD8+. Las células dendríticas tienen la capacidad de adquirir los antígenos exógenos, procesarlos y presentar epítopes antigénicos a través de las vías del HLA de clase I y de clase II. Esta presentación de epítopes, en presencia de la secreción de citosinas apropiadas y moléculas de co-estimulación, lleva a la expansión de los linfocitos T CD4 y CD8 en respuesta de antígenos específicos, por lo que las células dendríticas tienen un papel integral en la inducción de la respuesta antitumoral.³ En los carcinomas de mama, cuyos patrones histológicos en parte son similares a los tumores malignos de glándulas salivares, la respuesta inmune y la inmunoterapia con células dendríticas han sido motivo de estudio. Se ha visto que la respuesta inmune se encuentra atenuada por múltiples factores inhibidores. Existe evidencia del reclutamiento y activación de las células dendríticas en el cáncer de mama y la presencia de células dendríticas activadas intratumorales impacta favorablemente en la sobrevida. De hecho, está establecido que las células dendríticas participan en mecanismos críticos de interacción entre el cáncer y el sistema inmune; por ello, los intentos para crear una vacuna basada en células dendríticas con el fin de estimular el sistema inmune están dando resultados preliminares positivos; sin embargo, la falta de una respuesta clínica convincente o sostenida plantea dudas sobre su real funcionamiento, no obstante las respuestas inmunes obtenidas en los pacientes en fase terminal son alentadores.

En la presente Tesis hemos encontrado que el número de macrófagos CD68+ intratumorales correlacionaron también con los linfocitos T CD4+ y CD8+ intratumorales para los tumores de alto grado, así como CD68+ en zona de invasión con CD4+ y con CD3+ en zona de invasión. Sin embargo, las células dendríticas S100+ no mostraron correlaciones estadísticamente significativas.

Si bien son numerosos los estudios centrados en la cuantificación y significado funcional de los linfocitos infiltrantes (*tumour infiltrating lymphocytes*, TILs) en los tumores malignos de cabeza y cuello –que conceptualmente también se incluyen en este área de la

patología a las glándulas salivares- y de cavidad oral, ningún trabajo se ha centrado en el caso particular de los tumores malignos de glándulas salivares, al menos en la amplia revisión de la literatura que hemos realizado. En la presente Tesis los datos más significativos de la cuantificación de células inmunocompetentes han sido obtenidos en la zona periférica de infiltración tumoral, muchas veces asociadas a evidentes cambios de fibrosis y transformación desmoplásica. Estos hallazgos sugieren la participación de las células inmunocompetentes en la inmunomodulación del frente de invasión tumoral y en definitiva de los mecanismos de progresión tumoral en los tumores malignos salivares. Sin embargo nuestros datos de los TILs de los tumores malignos salivares son solo descriptivos y solamente podemos establecer una discusión con datos obtenidos de expresión de diferentes tipos de TILs en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, incluidos los carcinomas de la cavidad oral y nasofaringe, o con datos de Tils en series de tumores epiteliales malignos de otras localizaciones.

La valoración de los TILs ha sido explorada en pacientes con cáncer de cabeza y cuello evaluando la expresión de CD3, CD4, CD8 y Foxp3 antes de recibir tratamiento con quimiorradioterapia, encontrándose que los pacientes con una alta expresión inmunohistoquímica de CD3 y CD8 tuvieron un incremento significativo en la supervivencia, pero la expresión de CD4 y Foxp3 no demostró relevancia en la evolución clínica. Estos datos permitieron sugerir a los autores que los linfocitos infiltrantes de tumores pueden tener un papel pronóstico y pueden servir como biomarcador para identificar pacientes que pueden beneficiarse con la quimiorradioterapia definitiva.¹¹ Se sabe que las células T reguladoras tipo Tr1 originadas de los linfocitos CD4+CD25-, presentes en los TIL y en la sangre periférica de pacientes con carcinoma de cabeza y cuello, usan el TGF-B y la IL-10 para mediar la supresión tumoral.¹⁵ En los carcinomas de cabeza y cuello también se han relacionado altos niveles de CD3+ con una disminución en la frecuencia de metástasis, pero estudios más recientes investigando las células CD4+, CD8+, CD4 Foxp3+ ha llevado a Tong *et al.* a sugerir que un alto nivel de linfocitos CD8+ infiltrando tumores y un bajo nivel de Tregs se asocian con una evolución favorable.¹⁴⁰ Todos estos datos abren nuevas puertas de estudio que deberían explorarse en la evaluación de los mecanismos inmunológicos y en el significado molecular del inmunofenotipo de los TILs en los tumores malignos de glándulas salivares.

En un estudio de células inmunocompetentes en pacientes con carcinoma epidermoide de orofaringe, en el que los casos fueron divididos, al igual que en nuestro estudio de tumores salivares, en dos grupos: carcinomas epidermoides de bajo grado y tumores de alto grado y de comportamiento clínico agresivo, encontraron que en los pacientes de bajo grado, a mayor infiltración por linfocitos B CD20+ había un mejor control locoregional del tumor, pero para los pacientes de alto grado, la infiltración por un alto número de linfocitos B CD20+ se convertía en un factor pronóstico negativo. En nuestro estudio también los tumores salivares de alto grado tienen un elevado número de linfocitos B CD20+ en las zonas periféricas de infiltración tumoral. Estos datos son relevantes, puesto que se conoce la función protectora de los linfocitos B en el tejido tumoral, reportada en cáncer de pulmón, cáncer de mama y cáncer de próstata. En el grupo de bajo grado de los carcinomas epidermoides, los linfocitos intratumorales CD8+ fueron asociados con un mejor control loco regional del tumor y mayor supervivencia; de igual forma, la infiltración por CD3 y la relación baja entre CD3/Foxp3 se asociaron a un mejor pronóstico.³⁶

En carcinomas de células escamosas de la cavidad oral, al igual que ocurrió en nuestra serie de tumores salivares malignos, se encontró que estos carcinomas son infiltrados por un considerable número de células inmunes, las cuales son heterogéneas en su fenotipo inmunológico en relación a su distribución microscópica: aquellas en el estroma del cáncer son mayormente de fenotipo activante, mientras que las que se encuentran en los nidos de células neoplásicas son del fenotipo supresor. Estos autores concluyen que el balance estromal entre las células T CD8+ y las células Treg CCR4+ son uno de los indicadores pronósticos importantes en el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral y esto puede ayudar a seleccionar la terapia más apropiada, ya que los pacientes que muestran mayores cifras de Tregs CCR4+ tienen un pronóstico peor, por lo que se sugiere que el CCR4 puede servir como un blanco molecular en las nuevas terapéuticas contra el cáncer.¹⁵⁴

En el carcinoma nasofaríngeo se encuentran un gran número de TIL, la mayoría son células T, la presencia de TIL correlaciona con un mejor pronóstico. En otro estudio de cáncer de cavidad oral y de labio se vio que los pacientes con pocas células CD4+ presentaron un incremento significativo en su supervivencia en relación con los pacientes con

recuentos altos de células CD4+.¹⁰³ En los carcinomas de orofaringe, la asociación de HPV 16 y niveles en sangre periférica de linfocitos T CD8+, así como subpoblaciones de linfocitos CD8, CD4, CD68 y Treg (Foxp3), que infiltran tumores (TILs) tiene un pronóstico más favorable. En este estudio se correlacionó un elevado nivel de infiltración de células T con una evolución favorable del tumor; por ello, se piensa que puede reflejar la especial respuesta del sistema inmune del huésped y el microambiente tumoral en la homeostasis del cáncer.¹⁵³

Recientemente en carcinomas de cabeza y cuello y cavidad oral se está investigando la respuesta de TILs en las áreas de infiltración tumoral, tal como lo hemos diseñado en el presente estudio de células inmunocompetentes en tumores malignos de glándulas salivares. En un estudio de cáncer de cavidad oral sobre la densidad de CD4+/CD8+ TILs y la expresión de PD-L1 (ligando-1 del receptor de muerte programada que bloquea la función de linfocitos T y es expresada en células cancerosas y en los fibroblastos asociados a tumor, inhibiendo a los linfocitos que infiltran el tumor, lo cual influencia el crecimiento tumoral), las metástasis ganglionares y el estadio tumoral se encontraron significativamente asociados con la densidad peritumoral de TILs CD8+, la proteína PD-L1 se observó en el 89% de los casos y se asoció con las densidades de los TILs CD8+ peritumorales.²⁵

En relación con los mecanismos de desarrollo y progresión de los tumores malignos, se sabe que el comportamiento biológico de las células transformadas difiere sustancialmente del de las células normales. Se sabe que la proliferación y la supervivencia de las células normales están reguladas por cascadas de señales intra e intercelulares, iniciadas por mediadores solubles asociados a células, así como componentes de la matriz extracelular y componentes no celulares. En pacientes con transformación tumoral y evidente progresión hacia el desarrollo de un tumor maligno agresivo, estas vías están desreguladas, no solo en el tumor, sino también en las células estromales de las áreas infiltrativas o de las transformaciones desmoplásicas. Se ha demostrado que los pacientes con inmunodeficiencia iatrogénica o adquirida tienen una alta incidencia de malignidad lo cual sugiere un importante papel de la inmunovigilancia, mientras que en los que tienen un sistema inmune competente, representa una barrera adicional para la malignidad.¹⁴⁰

Además del escape inmune, los tumores son también efectivos en reclutar e introducir diversos subgrupos de células del huésped para promover la progresión tumoral, como células endoteliales, pericitos, fibroblastos y diversas células derivadas de la médula ósea, por ejemplo, los linfocitos T se consideran un componente esencial en la inmunidad antitumoral, con las células T CD8+ actuando como células efectoras citotóxicas y las células Th1 CD4+ actuando para ayudar e incrementar la magnitud y duración de la respuesta antitumoral; sin embargo, las células Th2 CD4+ y las células T reguladoras CD4+ son capaces de suprimir una efectiva respuesta antitumoral CD8+.

El presente estudio del inmunofenotipo de los TILs en los tumores malignos de glándulas salivares es inédito y de otra parte muy necesario, ya que puede abrir nuevas estrategias terapéuticas de aplicación en estos pacientes. De hecho, está establecido que la inmunoterapia es una modalidad atractiva de tratamiento porque, al ser contra blancos específicos, previene o minimiza los efectos colaterales e idealmente sus efectos terapéuticos son también en las metástasis distantes y, particularmente, en carcinomas asociados al alcohol, tabaco y papilomavirus, en los que la inmunoterapia ayuda a un adecuado procesamiento y presentación del antígeno por las células tumorales, que la hacen un blanco visible para el sistema inmune. Más aún, la desregulación inmune puede ser redireccionada favoreciendo el rechazo del tumor y, finalmente, la adecuada estimulación de las células T efectoras, capaces de una expansión in vivo y sobrevida en el microambiente tumoral, es fundamental para mejorar los resultados clínicos.²

El papel que desempeña el microambiente inmune en el carcinoma de mama, esto es, la respuesta inmune del huésped, es uno de los determinantes mayores de la evolución clínica del cáncer de mama; además, esta respuesta inmune es susceptible de ser modulada en la práctica clínica con un enfoque quimioinmunoterapéutico. El hecho de que en la última década la estrategia más exitosa en oncología para el cáncer de mama haya sido la combinación de quimioterapia e inmunoterapia pasiva merece una consideración especial, ya que los anticuerpos monoclonales han obtenido resultados impresionantes cuando se administran a la población correcta y su efecto se potencia cuando se combina con quimioterapia.³³ En este sentido, se ha publicado la importante relevancia clínica de los TILs

en cáncer de mama, utilizando *microarrays* de tejido de 894 carcinomas ductales y 164 carcinomas lobulares. En este estudio se encontró que los carcinomas ductales y lobulares de la glándula mamaria se encuentran infiltrados por diferentes subpoblaciones de linfocitos. En carcinomas ductales el incremento de TIL CD4 y Foxp3 se asocian con una mayor agresividad tumoral; sin embargo, en relación con el análisis de sobrevida los números absolutos de TILs no representan un indicador fundamental en el pronóstico de carcinomas ductales o lobulares, aunque los TILs en carcinoma ductal parecen representar un factor independiente de buen pronóstico.³⁸

Por último, en los carcinomas serosos de ovario de alto grado, los TIL pueden promover una evolución positiva con incremento de la supervivencia; sin embargo, ésta puede depender del ambiente tumoral y, sobre todo, de una buena vascularización con un buen aporte de oxígeno, ya que la supervivencia disminuye drásticamente cuando la vascularización es pobre y existen condiciones de hipoxia. Es más, estudios *in vitro* han demostrado que la hipoxia tiene un efecto dramático en la función de las células T activadas, induciendo la autofagia, el cual es un mecanismo bien establecido para la sobrevida de las células tumorales. En relación con estos mecanismos, se ha encontrado que en los tumores positivos para los TILs CD8+ y CD4+ se correlacionaron significativamente con una elevada vascularización.¹⁴³

En definitiva, se han identificado diversos mecanismos que median el escape del sistema inmune, como una subregulación de las moléculas HLA de clase I y de clase II, defectos de la función de antígenos asociados a tumor y sobreexpresión de moléculas inmunosupresoras (TGF- β , PGE2, IL-4, IL-10); todos estos hechos corroboran la importancia de la valoración de las subpoblaciones de linfocitos y el microambiente tumoral.¹⁴⁰ Sin duda estos estudios que se centran en los mecanismos inmunológicos asociados a los tumores, deben ser abordados en un futuro en la evaluación de los tumores malignos de glándulas salivares, ya que en la presente Tesis se ha evidenciado una importante repuesta de células inmunocompetentes en las áreas infiltrativas de todos los tipos histológicos estudiados, tanto en los tumores salivares de alto grado de malignidad como en los de bajo grado.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA. En los nódulos tumorales, el número de células inmunocompetentes CD3+, CD+, CD8+, CD20+, así como el número de macrófagos CD68+ y de células dendríticas S100+, es muy escaso, tanto en los tumores salivares de Alto Grado -Carcinoma Adenoide Quístico, Carcinoma de Células Acinares, Adenocarcinoma Ductal y Carcinoma Mucoepidermoide de Alto Grado- como en los tumores de Bajo Grado -Carcinoma Epitelial-Mioepitelial, Adenocarcinoma Polimorfo de Bajo Grado y Carcinoma Mucoepidermoide de Bajo Grado-, encontrándose solamente un significativo mayor número de macrófagos con respecto al número de linfocitos T y B.

SEGUNDA. En las zonas periféricas de infiltración tumoral, el número de células inmunocompetentes es significativamente superior en todos los tipos de tumores salivares. El número de linfocitos T CD4+ y de linfocitos T CD8+ es significativamente mayor que el de linfocitos B CD20+ en los Carcinomas Adenoide Quísticos, los Adenocarcinomas Ductales y Carcinoma Mucoepidermoide, incluido el subgrupo de alto grado de malignidad. No se han encontrado diferencias significativas cuando se compara el número de células de CD4+ con el número de células CD8+ en ninguno de los distintos tipos histológicos de tumores malignos de glándulas salivares.

TERCERA. En el grupo de tumores de alto grado y en el grupo de tumores de bajo grado, todos los marcadores de células inmunocompetentes evaluados demuestran un significativo mayor número de linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas en las áreas de infiltración tumoral.

CUARTA. En las áreas de infiltración tumoral, se ha encontrado una correlación positiva y significativa entre el número de linfocitos T CD4+ y linfocitos CD8+, tanto en el grupo de tumores salivares de alto grado como en el grupo de tumores de bajo grado, también se ha encontrado una correlación positiva significativa entre el número de linfocitos B y el número de linfocitos T CD8+ en el grupo de tumores de alto grado, pero no existen diferencias significativas cuando se comparan los conteos de células inmunocompetentes positivas inidentificadas con cada marcador específico.

RESUMEN

El estudio del perfil de células inmunocompetentes de los tumores malignos de glándulas salivares no ha sido previamente publicado; por ello, cuantificamos cada tipo de células linfoides en el centro del tumor y en las áreas de invasión. El estudio se realizó en un total de 49 casos, con los siguientes diagnósticos: Carcinoma mucoepidermoide (40.6%), Adenocarcinomas (18.5%), Carcinomas adenoide quísticos (14.5%), Carcinomas de células acinares (8.1%), Carcinomas mioepiteliales (6.1%), Carcinomas epitelial-mioepitelial (6.1%) y Adenocarcinomas polimorfos de bajo grado (6.1%). En todos los casos se cuantificó el perfil intratumoral y en las zonas periféricas de invasión tumoral de la expresión de CD3, CD4, CD8, CD20, CD 68, así como el número de células dendríticas S100+.

Hemos demostrado que en los tumores malignos salivares desencadena una repuesta inmunológica de tipo celular, la cual está mediada por linfocitos T CD4+ y CD8+, siendo significativamente mucho mayor el número de estos linfocitos T en las áreas infiltrativas del tumor. Los Linfocitos B CD20+ y los macrófagos y las células dendrítica S100+ son, asimismo, significativamente mucho más abundantes en las zonas infiltrativas y desmoplásicas. En los tumores malignos de alto grado hemos encontrado una correlación positiva alta ($p < 0.0001$) entre CD3 en la zona de invasión con CD3 en la zona intratumoral, y de CD8 en zona de invasión con CD4 en zona de invasión ($p < 0.0001$). El numero de macrófagos CD68+ intratumorales correlacionaron también con los linfocitos T CD4+ y CD8+ intratumorales para los tumores de alto grado, así como CD68+ en zona de invasión con CD4+ y con CD3+ en zona de invasión. Sin embargo, las células dendríticas S100+ no mostraron correlaciones estadísticamente significativas.

Actualmente tienen especial importancia los estudios de los mecanismos inmunológicos y la valoración del tejido linfoide asociado a los tumores TILs. Los resultados obtenidos en la presente Tesis evidencian una importante repuesta de células inmunocompetentes en las áreas infiltrativas de todos los tipos histológicos de tumores malignos salivares, tanto en los tumores salivares de alto grado de malignidad como en los de bajo grado. Los datos cuantitativos sugieren una participación de las células inmunocompetentes en la regulación de los mecanismos de respuesta tisular, en relación con la progresión de los tumores malignos de glándulas salivares.

SUMMARY

The study of immunocompetent cells of malignant salivary gland tumours has not been previously published; therefore we quantify each type of lymphoid cells in the centre of the tumour and in the areas of tumour invasion. The study was found in a total of 49 cases, with the following diagnoses: Mucoepidermoid carcinoma (40.6%), adenocarcinomas (18.5%), adenoid cystic carcinomas (14.5%), acinar cell carcinomas (8.1%), myoepithelial carcinomas (6.1%), epithelial-myoepithelial carcinomas (6.1%) and low grade polymorphous adenocarcinomas (6.1%). Expression profile of CD3, CD4, CD8, CD20, CD68, and the number of dendritic cells intratumoral S100+ was quantified in intratumoral and infiltrating areas.

In malignant salivary tumours, we have shown that cellular immune response is triggered, which is mediated by T lymphocytes CD4+ and CD8+, with a significantly greater number of these infiltrating T lymphocytes in invasive areas. The CD20+ B lymphocytes, macrophages, dendritic cells and S100+ are also significantly more abundant in infiltrative and desmoplastic areas. In the high-grade malignant tumours we found a high positive correlation ($p < 0.0001$) between CD3 in the area of invasion and CD3 in the intratumoral area, and CD8 with CD4 in invasion area. The number CD68 + macrophages in invasion area also correlated with T CD4+ and T CD3+ lymphocytes. S100+ dendritic cells showed no statistically significant correlations.

Currently are especially important studies of immunological mechanisms and the assessment of associated lymphoid tissue tumours (TILs). The results obtained in this thesis show a significant response of immunocompetent cells in infiltrative areas of all histological types of salivary malignancies in both salivary tumours highly malignant and low-grade. Quantitative data suggest an involvement of immunocompetent cells in the regulation of tissue response mechanisms in relation to the progression of malignant tumours of the salivary glands.

REFERENCIAS

1. **Abreu Ugarte JE, Rodríguez Obaya T, León Londín V, Rengifu Calzado E.** Estudio comparativo de las subpoblaciones de linfocitos T en carcinomas de la piel. *Rev Cubana Invest Biomed* 1995; 14:30-35.
2. **Albers AE, Strauss L, Liao T, Hoffmann TK, Kaufmann AM.** T cell-tumor interaction directs the development of immunotherapies in head and neck cancer. *Clin Dev Immunol* [Published online] 2010;2010:236378.
3. **Allan CP, Turtle CJ, Mainwaring PN, Pyke C, Hart DN.** The immune response to breast cancer, and the case for DC immunotherapy. *Cytotherapy* 2004;6: 154-163.
4. **American Federation for Aging Research (AFAR).** Infoaging Guide to Telomeres and Telomerase. New York: American Federation for Aging Research (AFAR); 2011. [Consultado el 20 de enero de 2014]. Disponible en: http://www.afar.org/docs/migrated/111121_I_NFOAGING_GUIDE_TELOMERESFR.pdf
5. **Arango PMC, Llanes FL, Moreno ML, Faxas GME.** Influencia de citocinas en respuesta citotóxica natural de pacientes con cáncer de mama. *Rev Cubana Oncol* 1999;15:186-192.
6. **Auclair PL.** Tumor-associated lymphoid proliferation in the parotid gland: a potential diagnostic pitfall. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;77:19-26.
7. **Aust S, Bachmayr-Heyda A, Pils D, Zhao L, Tong W, Berger A, Fogel M, Thalhammer T, Sehoul J, Horvat R, Zeillinger R, Castillo-Tong DC.** Determination of tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes in human ovarian cancer. *Int J Gynecol Pathol* 2013 32:269-276.
8. **Aziz KE, McCluskey PJ, Wakefield D.** Characterisation of follicular dendritic cells in labial salivary glands of patients with primary Sjogren syndrome: comparison with tonsillar lymphoid follicles. *Ann Rheum Dis* 1997;56:140-143.
9. **Azúa-Romeo J, Saura D, Guerrero M, Turner M, Saura E.** Expression of so-called adhesion proteins and DNA cytometric analysis in malignant parotid tumours as predictors of clinical outcome. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2014; 52:168-173.
10. **Balch CM, Riley LB, Bae YJ, Salmeron MA, Platsoucas CD, von Eschenbach A, Itoh K.** Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in human 120 cancers. *Arch Surg* 1990;125:200-205.
11. **Balermipas P, Michel Y, Wangenblast J, Seitz O, Weiss C, Rödel F, Rödel C, Fokas E.** Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemo-radiotherapy in head and neck cancer. *Br J Cancer* 2014;110:501-509.
12. **Barrera R. Raúl, Peralta Z. Oscar, Madrid M. Vicente.** Bases moleculares de la inmunología del cancer. *Salud Pública de Méx* 1995;37:344-253.
13. **Becker M, Müller CB, De Bastiani MA, Klamt F.** The prognostic impact of tumor-associated macrophages and intra-tumoral apoptosis in non-small cell lung cancer: *Histol Histopathol* 2014;29:21-31.
14. **Becknell B, Caligiuri MA.** Natural killer cells in innate immunity and cancer. *J Immunother* 2008;31:685-692.
15. **Bergmann C, Strauss L, Wang Y, Szczepanski MJ, Lang S, Johnson JT, Whiteside TL.** T regulatory type 1 cells in squamous cell carcinoma of the head and neck: mechanisms of suppression and expansion in advanced disease. *Clin Cancer Res* 2008;14:3706-3715.
16. **Bevilacqua G, Costa J, Fernández PL.** Molecular pathology. *Rev Esp Patol* 1999;32:420-423.
17. **Blanquez MJ, Regadera J, Mariño J, Newman RE, Notario V.** Gradual deregulation and loss of PCPH expression in the progression of human laryngeal neoplasia. *Mol Carcinogen*

- 2002;35:186-195.
18. **Blasco M A, Gasser SM, Lingner J.** Telomeres and telomerase. *Genes Dev* 1999;13:2353-2359.
 19. **Bremnes RM, Al-Shibli K, Donnem T, Sirera R, Al-Saad S, Andersen S, Stenvold H, Camps C, Busund LT.** The role of tumor-infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011;6:824-833.
 20. **Burnet FM.** The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970;13:1-27.
 21. **Casanova JF, Torres A, Martínez-García F, Hardisson D, Nistal M, Regadera J.** Statistical considerations in the methodology of quantifying immune-competent cells in tumors. *Anal Quant Cytol Histol* 1999;21:227-234.
 22. **Chan JK, Tsang WY, Hui PK, Ng CS, Sin VC, Khan SM, Siu LL.** T and T/natural killer-cell lymphomas of the salivary gland: a clinicopathologic, immunohistochemical and molecular study of six cases. *Hum Pathol* 1997;28:238-245.
 23. **Chan MS, Wang L, Felizola SJ, Ueno T, Toi M, Loo W, Chow LW, Suzuki T, Sasano H.** Changes of tumor infiltrating lymphocyte subtypes before and after neoadjuvant endocrine therapy in estrogen receptor-positive breast cancer patients—an immunohistochemical study of Cd8+ and Foxp3+ using double immunostaining with correlation to the pathobiological response of the patients. *Int J Biol Markers* 2012;27:e295-304.
 24. **Chilla R, Casjens R, Eysholdt U, Droese M.** Malignant salivary gland tumors. Effect of histology and site on prognosis. *HNO* 1983;31:286-290.
 25. **Cho YA, Yoon HJ, Lee JI, Hong SP, Hong SD.** Relationship between the expressions of PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011;47:1148-1153.
 26. **Ciccone E, Truini M, Grossi CE.** Lymphoid complement of the human salivary glands: function and pathology. *Eur J Morphol* 1998;36 Suppl:252-256.
 27. **Coll J, Gambús G, Corominas J, Tomas S, Esteban JI, Guardia J.** Immunohistochemistry of minor salivary gland biopsy specimens from patients with Sjögren's syndrome with and without hepatitis C virus infection. *Ann Rheum Dis* 1997;56:390-392.
 28. **College of American Pathologists (CAP).** Head and Neck, Salivary Glands 3.1.0.1. based on AJCC/UICC TNM, 7th edition. Protocol web posting date, November 2011.
 29. **Corominas JM.** Desenmascaramiento y recuperación de antígenos en inmunohistoquímica. *Patología* 1997;30:73-77.
 30. **Cros J, Sbidian E, Hans S, Roussel H, Scotte F, Tartour E, Brasnu D, Laurent-Puig P, Bruneval P, Blons H, Badoual C.** Expression and mutational status of treatment-relevant targets and key oncogenes in 123 malignant salivary gland tumours. *Ann Oncol* 2013;24:2624-2629.
 31. **Dardick I, Byard RW, Carnegie JA.** A review of the proliferative capacity of major salivary glands and the relationship to current concepts of neoplasia in salivary glands. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990;69:53-67.
 32. **Dardick I, van Nostrand AW.** Morphogenesis of salivary gland tumors. A prerequisite to improving classification. *Pathl Annu* 1987;22 (Pt1): 1-53.
 33. **de la Cruz-Merino L, Barco-Sánchez A, Henao Carrasco F, Nogales Fernández E, Vallejo Benítez A, Brugal Molina J, Martínez Peinado A, Grueso López A, Ruiz Borrego M, Codes Manuel de Villena M, Sánchez-Margalet V, Nieto-García A, Alba Conejo E, Casares Lagar**

- N, Ibáñez Martínez J.** New insights into the role of the immune micro-environment in breast carcinoma. *Clin Dev Immunol* [Published online] 2013; 2013:785317.
34. **DiGiuseppe JA, Corio RL, Westra WH.** Lymphoid infiltrates of the salivary glands: pathology, biology and clinical significance. *Curr Opin Oncol* 1996;8: 232-237.
 35. **Dioguardi M, Santarelli A, Compilato D, Campisi G, Lo Muzio LL.** Salivary gland tumors in patients with necrotizing sialometaplasia: a case series. *Ann Stomatol* (Roma) 2013;4(Suppl 2):1-48.
 36. **Distel LV, Fickenscher R, Dietel K, Hung A, Iro H, Zenk J, Nkenke E, Büttner M, Niedobitek G, Grabenbauer GG.** Tumour infiltrating lymphocytes in squamous cell carcinoma of the oro- and hypopharynx: prognostic impact may depend on type of treatment and stage of disease. *Oral Oncol* 2009;45: e167-74.
 37. **Donadio E, Giusti L, Seccia V, Ciregia F, da Valle Y, Dallan I, Ventroni T, Giannaccini G, Sellari-Franceschini S, Lucacchini A.** New Insight into benign tumours of major salivary glands by proteomic approach. *PLoS One* 2013;8: e71874.
 38. **Droeser R, Zlobec I, Kilic E, Güth U, Heberer M, Spagnoli G, Oertli D, Tapia C.** Differential pattern and prognostic significance of CD4+, FOXP3+ and IL-17+ tumor infiltrating lymphocytes in ductal and lobular breast cancers. *BMC Cancer* 2012;12:134.
 39. **Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD.** Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3:991-998.
 40. **Dwivedi N, Agarwal A, Raj V, Chandra S.** Histogenesis of salivary gland neoplasms. *Indian J Cancer* 2013;50: 361-366.
 41. **Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW.** Tumor induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukocyte Biol* 1998;64:275-290.
 42. **Ellis GL, Auclair PL.** Tumors of the salivary glands. In: Atlas of Tumor Pathology. 4th Series, Fascicle 9. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 2008.
 43. **El-Nagdy S, Salama NM, Mourad MI.** Immunohistochemical clue for the histological overlap of salivary adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma. *Interv Med Appl Sci* 2013;5:131-139.
 44. **Fadare O, Hileeto D, Gruddin YL, Mariappan MR.** Sclerosing muco-epidermoid carcinoma of the parotid gland. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128: 1046-1049.
 45. **Faur AC, Lazar E, Cornianu M.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and microvascular density in salivary gland tumours. *APMIS* 2013. [Epub ahead of print].
 46. **Fiaschi M, Kolterud A, Nilsson M, Toftgard R, Rozelli B.** Targeted expression of gli 1 in the salivary glands results in an altered differentiation program hyperplasia. *Am J Pathol* 2011; 179:2569-2579.
 47. **Fok TC, Lapointe H, Tuck AB, Chambers AF, Jackson-Boeters L, Daley TD, Darling MR.** Expression and localization of osteopontin, homing cell adhesion molecule/CD44, and integrin $\alpha\beta 3$ in pleomorphic adenoma, polymorphous low-grade adenocarcinoma, and adenoid cystic carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013;116:743-751.
 48. **Frade González C, Garcia-Caballero T, Lozano Ramireaz A, Labella Caballero T.** Cell proliferation in salivary gland tumors. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2001;52:456-460.
 49. **Franchi A, Santoro R, Paglierani M, Bondi R.** Comparison of integrin alpha

- chain expression in benign and malignant salivary gland tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;83:588-595.
50. **Freeman MR, Schneck FX, Gagnon ML, Corless C, Soker S, Niknejad K, Peoples GE Klagsbrun M.** Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res* 1995; 55:4140-4145.
 51. **Gaffey MJ, Frierson HF Jr, Mills SE, Boyd JC, Zarbo RJ, Simpson JF, Gross LK, Weiss LM.** Medullary carcinoma of the breast. Identification of lymphocyte subpopulations and their significance. *Mod pathol* 1993;6:721-728.
 52. **Gandour-Edwards R, Kapadia SB, Gumerlock PH, Barnes L.** Immunolocalization of interleukin-6 in salivary gland tumors. *Hum Pathol* 1995;26:501-503.
 53. **Gannot G, Gannot I, Vered H, Buchner A, Keisari Y.** Increase in immune cell infiltration with progression of oral epithelium from hyperkeratosis to dysplasia and carcinoma. *Br J Cancer* 2002;86:1444-1448.
 54. **Gnepp DR, Henley JD, Simpson RHW, Eveson J.** Diagnostic Surgical Pathology of the head and neck, 2^a Ed. Ed Saunders Elsevier, 2009, pp: 413-262.
 55. **Golusiński W, Wegner A, Trzeciak P, Golusiński P, Sówka M, Kopczyński A, Bromboszcz M, Marszałek A.** The expression assessment of the estrogen, progesterone and HER2 receptors in selected malignant tumors of the salivary glands. *Otolaryngol Pol* 2013; 67:245-251.
 56. **Grimaud JA, Bosman F, Baroni C.** Telomeres and telomerases. *Rev Esp Patol* 1999;32: 471-472.
 57. **Gross E, Sunwoo JB, Bui JD.** Cancer Immunosurveillance and immune-editing by natural killer cells. *Cancer J* 2013;19:483-489.
 58. **Grossman Z, Herberman RB.** "Immune surveillance" without immunogenicity. *Immunol Today* 1986;7:128-131.
 59. **Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, Ravoet M, Le Buanec H, Sibille C, Manfouo-Foutsop G, Veys I, Haibe-Kains B, Singhal SK, Michiels S, Rothé F, Salgado R, Duvillier H, Ignatiadis M, Desmedt C, Bron D, Larsimont D, Piccart M, Sotiriou C, Willard-Gallo K.** CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest* 2013;123:2873-2892.
 60. **Guzzo M, Locati LD, Prott FJ, Gatta G, McGurk M, Licitra L.** Major and minor salivary gland tumors. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010;74:134-148.
 61. **Harris NL.** Lymphoid proliferations of the salivary glands. *Am J Clin Pathol* 1999;111(1 Suppl 1):S94-103.
 62. **Hellquist HB, Karlsson MG, Viale G, Karlsson C, Davidsson A, Dell'Orto P, Olofsson J.** Bcl-2 immunoreactivity in salivary gland neoplasms is unrelated to the expression of mRNA for natural killer cell stimulatory cytokines interleukin (IL)-2 and IL-12. *Virchows Arch* 1996;429:149-158.
 63. **Höfler H, David L, Cerdón-Cardo C.** Relevant topics in molecular pathology. *Rev Esp Patol* 1999;32:267-279.
 64. **Hsu SM, Raine L, Fanger H.** Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-580.
 65. **Huguet P, Bosch JA, Raventós A, Jacas C, Sanjosé A, Vilardell M.** Sjogren's syndrome: histologic and immunohistochemical study. *Ann Med Interne (Paris)* 1995;146:233-234.
 66. **Ianez FR, Buim ME, Coutinho-Camillo CM, Schultz R, Soares FA, Lourenço SV.**

- Human salivary gland morphogenesis: myoepithelial cell maturation assessed by immunohistochemical markers. *Histopathology* 2010;57:410-417.
67. **Ioachim HL.** The stromal reaction of tumors: an expression of immune surveillance. *J Natl Cancer Inst* 1976; 57:465-475.
 68. **Ioachim HL.** Lymphoid Hyperplasias and Lymphomas of Salivary Glands. *Pathology Case Reviews* 2004;9:206-213.
 69. **Isacsson G, Shear M.** Intraoral salivary gland tumors: a retrospective study of 201 cases. *J Oral Pathol* 1983;12:57-62.
 70. **Jeng YM, Lin CY, Hsu HC.** Expression of the c-kit protein is associated with certain subtypes of salivary gland carcinoma. *Cancer Lett* 2000;154:107-111.
 71. **Kaneda Y, Yamaai T, Mizukawa N, Nagatsuka H, Yamachika E, Gunduz M, Sawaki K, Yamanishi Y, Matsubara M, Katase N, Takagi S.** Localization of antimicrobial peptides human beta-defensins in minor salivary glands with Sjögren's syndrome. *Eur J Oral Sci* 2009; 117:506-510.
 72. **Karja V, Syrjanen K, Syrjanen S.** Collagen IV and tenascin immune-reactivity as prognostic determinant in benign and malignant salivary gland tumours. *Acta Otolaryngol* 1995;115: 569-575.
 73. **Karja VJ, Syrjanen KJ, Syrjanen SM.** Immunocompetent cells in benign and malignant salivary gland tumors. *Gen Diagn pathol* 1996;142:75-81.
 74. **Kernohan NM, Blessing K, King G, Corbett IP, Miller ID.** Expression of c-erbB-2 oncoprotein in salivary gland tumors: an immunohistochemical study. *J Pathol* 199;163:77-80.
 75. **Key M.** Immunohistochemistry Staining Methods. In: George L Kumar and Lars Rudbeck (eds.): Education Guide. Immunohistochemical (IHC) Staining Methods, 5th ed. Dako North America, Carpinteria, California. 2009, pp: 57-60. Disponible en: http://www.dako.com/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf
 76. **Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J.** Robbins y Cotran Patología Estructural y Funcional, 8ª ed. Ed Elsevier. 2010.
 77. **Kumar GL, Rudbeck L.** Education Guide. Immunohistochemical (IHC) Staining Methods, 5th ed. Dako North America, Carpinteria, California, 2009. Disponible en: http://www.dako.com/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf
 78. **Kyo S, Takakura M, Inoue M.** Telomerase activity in cancer as a diagnostic and therapeutic target. *Histol Histopathol* 2000;15: 813-824.
 79. **Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA.** Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin* 1998;48:6-29.
 80. **Lavie F, Miceli-Richard C, Quillard J, Roux S, Leclerc P, Mariette X.** Expression of BAFF (BLyS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *J Pathol* 2004;202:496-502.
 81. **Le A, Saverin M, Hand AR.** Distribution of dendritic cells in normal human salivary glands. *Acta Histochem Cytochem* 2011;44:165-173.
 82. **Lee WH, Tseng TM, Hsu HT, Lee FP, Hung SH, Chen PY.** Salivary gland tumors: A 20-year review of clinical diagnostic accuracy at a single center. *Oncol Lett* 2014;7:583-587.
 83. **Lim SH, Thomas DW, Coleman S, Stephens P.** T cell receptor Vbeta repertoire of tumour-infiltrating lymphocytes in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 1996;42:69-70.
 84. **Liu F, Wang S.** Molecular cues for development and regeneration of salivary glands. *Histol Histopathol* 2014; 29:305-312.
 85. **Lleonart ME, Sanchez R, Martin-Duque**

- P, Ramón y Cajal S. Técnicas de hibridación, clonación y secuenciación de ácidos nucleicos en el diagnóstico anatomopatológico. *Rev Esp Patol* 1997;30:249-257.
86. Lockhart RD, Hamilton GF, Fyfe FW. Anatomía Humana. 1a ed. Nueva Editorial Interamericana, México, 1965.
 87. Lombaretti IM, Knox SM, Hoffman MP. Salivary gland progenitor cell biology provides a rationale for therapeutic salivary gland regeneration. *Oral Dis* 2011;17:445-449.
 88. López V, González-Peramato P, Suela J, Serrano A, Algaba F, Cigudosa JC, Vidal A, Bellmunt J, Heredero O, Sánchez-Carbayo M. Identification of p16 amplification (1q23.3-q24.1) in bladder cancer using comparative genomic hybridization (CGH) arrays of urinary DNA. *J Transl Med* 2013;11:182.
 89. Luna MA, Batsakis JG, el-Naggar AK. Salivary gland tumors in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991;100:869-871.
 90. Mahlstedt K, Ussmuller J, Donath K. Value of minor salivary gland biopsy in diagnosing Sjogren's syndrome. *J Otolaryngol* 2002;31:299-303.
 91. Manjunatha BS, Kumar GS, Raghunath V. Immunohistochemical expression of Bcl-2 in benign and malignant salivary gland tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16:e503-507.
 92. Mannweiler S, Beham A, Langner C. MUC1 and MUC2 expression in salivary gland tumors and in non-neoplastic salivary gland tissue. *APMIS* 2003;111: 978-984.
 93. Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62:71-109.
 94. Mariani SM; American Association of Immunologists. Cancer and the immune response: Improving the odds. *MedGenMed* 2003;5:8.
 95. Mark HF, Hanna I, Gnepp DR. Cytogenetic analysis of salivary gland type tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82:187-192.
 96. Martínez-Madrigal F, Bosq J, Casiraghi O. Major salivary glands. In Stacey E Mills (ed): *Histology for Pathologists*, 5^a ed. Wolters Kluwer & Lippincott Williams & Wilkins. 2012, pp: 477-502.
 97. Martínez-Madrigal F, Micheau C. Histology of the major salivary glands. *Am J Surg Pathol* 1989;13:879-899.
 98. Mendiola M, Barriuso J, Mariño-Enríquez A, Redondo A, Domínguez-Cáceres A, Hernández-Cortés G, Pérez-Fernández E, Sánchez-Navarro I, Vara JA, Suárez A, Espinosa E, González-Barón M, Palacios J, Hardisson D. Aurora kinases as prognostic biomarkers in ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 2009; 40:631-638.
 99. Mercader M, Bodner B, Moser MT, Kwon PS, Park ES, Manecke RG, Ellis TM, Wojcik EM, Yang D, Flanigan RC, Waters WB, Kast WM, Kwon ED. T cell infiltration of the prostate induced by androgen withdrawal in patients with prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:14565-14570.
 100. Miettinen M, McCue PA, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Czapiewski P, Wazny K, Langfort R, Waloszczyk P, Biernat W, Lasota J, Wang Z. GATA3: a multispecific but potentially useful marker in surgical pathology: a systematic analysis of 2500 epithelial and nonepithelial tumors. *Am J Surg Pathol* 2014;38:13-22.
 101. Mingari MC, Ponte M, Vitale C, Schiavetti F, Bertone S, Moretta L. Inhibitory receptors for HLA class I molecules on cytolytic T lymphocytes. Functional relevance and implications for anti-tumor immune responses. *Int J Clin Lab Res* 1997;27:87-94.
 102. Mocellin S, Wang E, Marincola FM.

- Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. *J Immunother* 2001;24:392-407.
103. **Moreira G, Fulgêncio LB, DE Mendonça EF, Leles CR, Batista AC, DA Silva TA.** T regulatory cell markers in oral squamous cell carcinoma: Relationship with survival and tumor aggressiveness. *Oncol Lett* 2010;1:127-132.
 104. **Mosser DM, Edwards JP.** Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Rev Immunol* 2008;8:958-969.
 105. **Murakami M, Ohtani I, Hojo H, Wakasa H.** Immunohistochemical evaluation with ki-67: an application to salivary gland tumours. *J Laryngol Otol* 1992; 106:35-38.
 106. **Napier SS, Herron BT, Herron BM.** Acinic cell carcinoma in Northern Ireland: a 10-year review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1995;33:145-148.
 107. **Nasser SM, Faquin WC, Dayal Y.** Expression of androgen, estrogen, and progesterone receptors in salivary gland tumors. Frequent expression of androgen receptor in a subset of malignant salivary gland tumors. *Am J Clin Pathol* 2003;119:801-806.
 108. **Nistal M, García-Viera M, Martínez-García C, Paniagua R.** Epithelial-myoepithelial tumor of the bronchus. *Am J Surg Pathol* 1994;18:421-425.
 109. **Nistal M, Yebenes-Gregorio L, Esteban-Rodríguez I, Bernaldez R, Regadera J.** Malignant mixed tumor of the larynx. *Head Neck* 2005;27:166-170.
 110. **Ochsenbein AF, Klenerman P, Karrer U, Ludewig B, Pericin M, Hengartner H, Zinkernagel RM.** Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2233-2238.
 111. **Ohri C, Shikota A, Geenen R, Waller D, Radding P.** Macrophages within NSCLC tumor islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *Eur Respir J* 2009;33:118-126.
 112. **Panizo A, Idoate MA.** Doble marcaje en inmunohistoquímica. *Rev Esp Patol* 1998;31:287-290.
 113. **Pellin PA.** Bases moleculares de la transformación neoplásica. *Rev Esp Patol* 1998;31:427-434.
 114. **Pittet MJ.** Behavior of immune players in the tumor microenvironment. *Curr Opin Oncol* 2009;21:53-59.
 115. **Polihronis M, Tapinos NI, Theocharis SE, Economou A, Kittas C, Moutsopoulos HM.** Modes of epithelial cell death and repair in Sjogren's syndrome (SS). *Clin Exp Immunol* 1998;114:485-490.
 116. **Regadera JF, Rodríguez JI, Perera A, Mestre MJ.** Tumor mucoepidermoide pulmonar infantil. Estudio clínico-patológico de un caso y revisión de la literatura. *Ann Esp Pediatr* 1982;16: 249-253.
 117. **Rivas V, Carmona R, Muñoz-Chápuli R, Mendiola M, Nogués L, Reglero C, Miguel-Martín M, García-Escudero R, Dorn GW 2nd, Hardisson D, Mayor F Jr, Penela P.** Developmental and tumoral vascularization is regulated by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Clin Invest* 2013;123:4714-4730.
 118. **Rotellini M, Palomba A, Baroni G, Franchi A.** Diagnostic utility of PLAG1 immunohistochemical determination in salivary gland tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2013 [Epub ahead of print].
 119. **Roy P, Bullock MJ, Perez-Ordoñez B, Dardick I, Weinreb I.** Epithelial-myoepithelial carcinoma with high grade transformation. *Am J Surg Pathol* 2010; 34:1258-1265.
 120. **Saghravanian N, Ghazi N, Saba M.** Clinicopathologic evaluation of salivary gland neoplasms: a 38 year retrospective study in Iran. *Ann Diagn Pathol*

- 2013;17:522-525.
121. Saito I, Teratani K, Inoue M, Saito A, Funatsu K, Moro I. Immunohistochemical characterization of functional markers in human minor salivary gland tumors. *J Oral Pathol* 1984;13:525-534.
 122. Sanz-García C, Ferrer-Mayorga G, Gonzalez-Rodriguez A, Valverde AM, Martin-Duce A, Velasco-Martin JP, Regadera J, Fernandez M, Alemany S. Sterile inflammation in acetaminophen-induced liver injury is mediated by Cot/tpl2. *J Biol Chem* 2013;288:15342-15351.
 123. Schneider S, Kloimstein P, Pammer J, Brannath W, Grasl MC, Erovic BM. New diagnostic markers in salivary gland tumors. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013 [Epub ahead of print].
 124. Seifert G. The pathology of the salivary gland immune system. Diseases and correlations with other organ systems. *Surg Pathol* 1993;5:161-180.
 125. Shebl FM, Bhatia K, Engels EA. Salivary gland and nasopharyngeal cancers in individuals with acquired immune-deficiency syndrome in United States. *Int J Cancer* 2010;126:2503-2508.
 126. Shilo K, Foss RD, Franks TJ, DePeralta-Venturina M, Travis WD. Pulmonary mucoepidermoid carcinoma with prominent tumor-associated lymphoid proliferation. *Am J Surg Pathol* 2005;29:407-411.
 127. Shurin M, Salter Russell. Dendritic cells in Cancer. Ed Springer, 2009.
 128. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics, 2013. *Ca Cancer J Clin* 2013;63:11-30.
 129. Skalova A, Leivo I. Cell proliferation in salivary gland tumors. *Gen Diagn Pathol* 1996;142:7-16.
 130. Soini Y, Paakko P, Virtanen I, Lehto VP. Tenascin in salivary gland tumours. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992;421:217-222.
 131. Soma L, LiVolsi VA, Baloch ZW. Dendritic interstitial and myofibroblastic cells at the border of salivary gland tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:232-236.
 132. Speight PM, Barrett AW. Salivary gland tumours. *Oral Dis* 2002;8:229-240.
 133. Sung MW, Kim KH, Kim JW, Min YG, Seong WJ, Roh JL, Lee SJ, Kwon TK, Park SW. Clinicopathologic predictors and impact of distant metastasis from adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:1193-1197.
 134. Suzzi MV, Alessi A, Bertarelli C, Cancellieri A, Procaccio L, Dall'olio D, Laudadio P. Prognostic relevance of cell proliferation in major salivary gland carcinomas. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2005;25:161-168.
 135. Tabbara K, Sharara N. Sjogren's syndrome: pathogenesis. *Eur J Ophthalmol* 1999;9:1-7.
 136. Takezawa K, Jackson C, Gnepp DR, King TC. Molecular characterization of Warthin tumor. *Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:569-575.
 137. Thariat J, Vedrine PO, Orbach D, Marcy PY, Badoual C, Butori C, Teissier N, Toussaint B, Castillo L. Salivary gland tumors in children. *Bull Cancer* 2011;98:847-855.
 138. Tian W, Yakirevich E, Matoso A, Gnepp DR. IgG4(+) plasma cells in sclerosing variant of mucoepidermoid carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2012;36:973-979.
 139. Tomás S, Coll J, Reth P, Corominas JM. Immunohistochemical study of inflammatory infiltrates in minor salivary glands in Sjogren's syndrome and other autoimmune diseases. *Med Clin (Barc)* 1998;111:681-686.
 140. Tong CC, Kao J, Sikora AG. Recognizing and reversing the immunosuppressive tumor microenvironment of head and

- neck cancer. *Immunol Res* 2012;54:266-274.
141. **Torres A, Casanova JF, Nistal M, Regadera J.** Quantification of immuno-competent cells in testicular germ cell tumours. *Histopathology* 1997;30:23-30.
 142. **Tortora Gerard J, Reynolds Grabowsky S.** Principios de Anatomía y Fisiología. 9ª ed. México, D.F.: Oxford University Press, 2002.
 143. **Townsend KN, Spowart JE, Huwait H, Eshragh S, West NR, Elrick MA, Kalloger SE, Anglesio M, Watson PH, Huntsman DG, Lum JJ.** Markers of T cell infiltration and function associate with favorable outcome in vascularized high-grade serous ovarian carcinoma. *PLoS One* 2013;8:e82406.
 144. **van Blokland SC, Wierenga-Wolf AF, van Helden-Meeuwsen CG, Drexhage HA, Hooijkaas H, van de Merwe H, van de Merwe JP, Versnel MA.** Professional antigen presenting cells in minor salivary glands in Sjogren's syndrome: potential contribution to the histopathological diagnosis? *Lab Invest* 2000; 80:1935-1941.
 145. **Van Ravenswaay Claasen HH, Kluin PM, Fleuren GJ.** Tumor infiltrating cells in human cancer. On the possible role of CD 16 + macrophages in antitumor cytotoxicity. *Lab Invest* 1992;67:166-174.
 146. **Vargas PA, Gerhard R, Araujo Filho VJ, de Castro IV.** Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrsopective study of 124 cases. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2002;57:271-276.
 147. **Vasenwala SM, Aziz M, Rattan A, Ahmad KN.** Immunological status of patients in carcinoma head and neck. *Indian J Cancer* 1989;26:137-144.
 148. **Viale G, Battifora H, Riera JR.** Advances in standardization of immunohistochemistry. *Rev Esp Patol* 1999;32:155-160.
 149. **Vigneswaran N, Müller S, DeRose P, Cohen C.** Cathepsin-D and tumor associated antigen DF3 in salivary gland neoplasia. Differential diagnostic and prognostic applications. *Pathol Res Pract* 1994;190:1174-1184.
 150. **Viguer García Moreno JM, Fraga Fernández FJ, Regadera González JF, Carrillo Gijón R, Grande Icaran I.** Carcinoma adenoide quístico del pulmón diagnosticado por cepillado bronquial. Presentación de dos casos. *Citología* 1982;3:193-198.
 151. **Villano Bonamin L, Barbuto JA, Malucelli BE.** Effects of social isolation on ehrlich tumor growth and tumor leukocyte infiltration in mice: evidence of participation of the submaxillary salivary gland. *Neuroimmunomodulation* 2001;9:313-318.
 152. **Wade TV, Livolsi VA, Montone KT, Baloch ZW.** A cytohistologic correlation of mucoepidermoid carcinoma: emphasizing the rare oncocytic variant. *Patholog Res Int* 2011;2011:135796.
 153. **Wansom D, Light E, Thomas D, Worden F, Prince M, Urba S, Chepeha D, Kumar B, Cordell K, Eisbruch A, Taylor J, Moyer J, Bradford C, D'Silva N, Carey T, McHugh J, Wolf G; UM Head Neck SPORE Program.** Infiltrating lymphocytes and human papillomavirus-16-associated oropharyngeal cancer. *Laryngoscope* 2012;122:121-127.
 154. **Watanabe Y, Katou F, Ohtani H, Nakayama T, Yoshie O, Hashimoto K.** Tumor-infiltrating lymphocytes, particularly the balance between CD8(+) T cells and CCR4(+) regulatory T cells, affect the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109: 744-752.
 155. **Weinreb I.** Translocation-associated salivary gland tumors: a review and update. *Adv Anat Pathol* 2013;20:367-377.

-
156. **Whiteside TL.** Immune responses to cancer: are they potential biomarkers of prognosis? *Front Oncol* 2013;3:107.
157. **Winter J, Pantelis A, Kraus D, Reckenbeil J, Reich R, Jepsen S, Fisher HP, Allam JP, Novak N, Wenghoefer M.** Human α -defensin (DEFA) gene expression helps to characterise benign and malignant salivary gland tumours. *BMC Cancer* 2012;12:465. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/12/465>.
158. **Xanthou G, Tapinos NI, Polihronis M, Nezis IP, Margaritis LH, Moutsopoulos HM.** CD4 cytotoxic and dendritic cells in the immunopathologic lesion of Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1999;118:154-163.
159. **Yanai H, Sato Y, Nagatsuka H, Yoshino T.** Nestin is a wide-spectrum abluminal cell marker of salivary gland tumors. *Pathol Int* 2013;63:496-501.
160. **Yáñez M, Roa I, García M, Ibacache G, Villaseca M.** Bcl-2 gene protein expression in salivary gland tumors. *Rev Med Chil* 1999;127:139-142.
161. **Zhang YL, Li J, Mo HY, Qiu F, Zheng LM, Qian CN, Zeng YX.** Different subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC progression in different ways. *Mol Cancer* 2010;9:4.